

**Die Rolle des RNA-bindenden Proteins Rrm4
während des polaren Wachstums von
*Ustilago maydis***



**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

**dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von**

**Janine Koepke
aus Lich**

**Marburg/Lahn
November 2010**

**Vom Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
angenommen am: _____**

**Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Michael Feldbrügge
Zweitgutachter: Herr Jun. -Prof. Dr. Martin Thanbichler**

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2005 bis November 2010 in Marburg am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung für Organismische Interaktionen unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Michael Feldbrügge durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

J. König, S. Baumann, J. Koepke, T. Pohlmann, K. Zarnack, und M. Feldbrügge (2009)
The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of *ubi1* and *rho3* mRNAs. *EMBO J.* 28: 1855 - 1866

J. Koepke, F. Kaffarnik, K. Zarnack, R. Kellner, D. Begerow und M. Feldbrügge (2010)
The RNA-binding protein Rrm4 is essential for efficient secretion of endochitinase Cts1. *Mol Cell Proteomic.* revised manuscript in preparation

Weitere wissenschaftliche Beiträge:

M. Feldbrügge, K. Zarnack, E. Vollmeister, S. Baumann, J. Koepke, J. König, M. Münsterkötter, und G. Mannhaupt (2008) The posttranscriptional machinery of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet. Biol.* 45: S40-S46

Summary

Microtubule-dependent transport of mRNA in form of ribonucleoprotein (RNP) particles is a common mechanism for local restriction of protein synthesis and is essential for the establishment or maintenance of cell polarity during differentiation and development. Pathogenic development of *Ustilago maydis* depends on the formation of infectious filaments that grow with a defined axis of polarity. The RNA-binding protein Rrm4 mediates microtubule-dependent transport of distinct mRNAs in these filaments and loss of transport correlates with defects in polarity. Although a number of potential target mRNAs could be identified, cellular processes that depend on Rrm4-mediated transport remain largely unknown. Based on differential proteomics we identified seven differentially regulated protein-variants in *rrm4Δ* filaments involved in cell wall remodelling, translation and mitochondrial function. Consequently, we uncovered that the mRNA encoding the bacterial-type endochitinase Cts1 represents a direct target of Rrm4. In wild type filaments the encoded protein localizes predominantly at the growth cone, whereas it accumulates at both poles in *rrm4Δ* filaments. Filaments of *cts1Δ* mutants aggregate in liquid culture suggesting an altered cell surface. By activity measurements we demonstrated that Cts1 is secreted and associates most likely with the cell wall of filaments. Secretion is drastically impaired in filaments lacking Rrm4 or conventional kinesin Kin1 as well as in filaments with disrupted microtubules. Thus, Rrm4-mediated mRNA transport appears to be essential for efficient export of Cts1, uncovering a novel molecular link between mRNA transport and secretion. Additionally we identified three proteins of the mitochondrial inner membrane including the AAA protease Rca1. Preliminary results indicate that efficient mitochondrial import is disturbed in *rrm4Δ* strains resulting in increased production of mitochondrial superoxide.

To get more insights into the process of this mRNA-transport, we performed localization studies of the poly(A)-binding protein Pab1. Pab1 colocalizes with Rrm4 *in vivo* in almost all shuttling particles. Interestingly, in *rrm4Δ* filaments, Pab1 is no longer present in shuttling particles. Thus, the RNA-binding protein Rrm4 constitutes a key component of microtubule-dependent mRNA transport in the filamentous fungus *Ustilago maydis*. It seems that active mRNP transport is involved in apical secretion and might be important to support symmetric import of mitochondrial proteins.

Zusammenfassung

Polarität und funktionelle Kompartimentierung sind grundlegende Konzepte eukaryontischer Zellen. Der aktive Transport von Vesikeln, Proteinen und mRNA entlang des Zytoskeletts ist ein wichtiger Bestandteil bei der Etablierung und Aufrechterhaltung einer zellulären Polaritätsachse. In *Ustilago maydis* ist das RNA-bindende Protein Rrm4 am Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transport spezifischer Transkripte während der Filamentbildung beteiligt. Dieser Transportprozess ist wichtig für das polare, filamentöse Wachstum und die Pathogenität des Pilzes. Der Verlust von Rrm4 führt zu erhöhtem bipolarem Wachstum und einer gedrungenen Filamentmorphologie. Die eigentliche zellbiologische Funktion dieses mRNA-Langstreckentransportes ist noch weitestgehend ungeklärt. In dieser Arbeit wurden, basierend auf einer differentiellen Proteom-Analyse zwischen Wildtyp- und *rrm4Δ*-Filamenten, sieben differentiell exprimierte Proteine identifiziert. Ihre funktionelle Analyse spricht für eine Beteiligung des Rrm4-abhängigen mRNA-Transportes an der Sekretion eines Zellwand-abbauendem Enzyms und der Biogenese von Mitochondrien. Die Deletion von *rrm4* resultierte in einer intrazellulären Akkumulation der Endochitinase Cts1, wobei weder die subapikale Lokalisation noch die Aktivität der Cts1 beeinträchtigt wurde. Zudem bestätigte eine FISH-Analyse die *cts1*-mRNA als direktes Ziel-Transkript von Rrm4 und die Anreicherung der Cts1 konnte auf einen Defekt in der Sekretion von *rrm4Δ*-Filamente zurückgeführt werden. Des Weiteren wurde anhand von drei differentiell exprimierten Mitochondrienproteinen in *rrm4Δ*-Filamenten eine Dysfunktion identifiziert, welche sich in einer gesteigerten mitochondrialen Superoxid-Produktion äußerte. Um weitere Einblicke in den mRNA-Transport zu gewinnen, wurde eine Lokalisationsstudie des Poly-(A)-bindende Proteins (Pab1) durchgeführt. In Wildtyp-Filamenten ko-lokalisierte Pab1 mit Rrm4, *in vivo*, in pendelnden Partikeln. Interessanterweise wurden in *rrm4Δ*-Filamenten keine sich bewegendenden Pab1-Partikel detektiert. Folglich bildet Rrm4 die Haupttransporteinheit des mRNA-Langstreckentransports in Filamenten. Dementsprechend reguliert der Rrm4-abhängige mRNA-Transport apikale Sekretionsprozesse und scheint zusätzlich die gleichmäßige Versorgung des Protein-Imports in die Mitochondrien zu steuern.

Abkürzungen und Fachbegriffe

2D	zwei-dimensional
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar(e)
Cbp	Calmodulin-bindendes Peptid
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLIP	<i>ultraviolet crosslinking and immunoprecipitation</i>
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DIC	<i>differential interference contrast</i>
DIGE	<i>2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis</i>
EJC	<i>exon-junction complex</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
FISH	<i>fluorescence in situ hybridisation</i>
Gfp	<i>(enhanced) green fluorescent protein</i>
GZE	Gesamt-Zellextrakt
H ₂ O _{bid}	zweifach destilliertes Wasser
kbp	Kilobasenpaar(e)
kD	Kilodalton
LC-ESI-MS/MS	<i>liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry</i>
MAPF	Membran-assoziierte Proteinfraction
MIPS	<i>Munich Information Center for Protein Sequences</i>
M	molar
mM	millimolar
μM	micromolar
mRNP	Boten-Ribonukleoprotein
MUMDB	<i>MIPS Ustilago maydis DataBase</i>
MG	Molekulargewicht
nt	Nukleotid(e)
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
P	Phosphat
p.a.	<i>pro analysi</i> , Klassifikation der Reinheitsstufe
PA	Protein A
pI	isoelektrische Punkt
PIA	<i>peak-identifying algorithm</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
U	<i>unit</i> , Enzymeinheit
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
wt	Wildtyp
ZPF	zytoplasmatische Proteinfraction

Inhaltsverzeichnis

	Summary	I
	Zusammenfassung	II
	Abkürzungen und Fachbegriffe	III
	Inhaltsverzeichnis	IV-VI
1	Einleitung	1
1.1	Der Modellorganismus <i>Ustilago maydis</i>	1
1.2	Polares Wachstum in filamentösen Pilzen	5
1.3	mRNA-Transport und lokale Translation in höheren Eukaryonten	6
1.4	mRNA-Transport in Pilzen	9
1.5	Mikrotubuli-abhängiger mRNA-Transport in <i>U. maydis</i>	10
1.6	Proteomanalyse zur Charakterisierung der Funktion von Rrm4 in Filamenten	12
1.7	Zielsetzung dieser Arbeit	15
2	Ergebnisse	16
2.1	Identifizierung der differentiell exprimierten Protein-Spezies	16
2.2	Sequenzanalyse der Endochitinase Cts1	18
2.3	Die Deletion von <i>cts1</i> hat keinen Einfluss auf das filamentöse Wachstum und auf die Pathogenität	20
2.4	Die <i>cts1</i> -mRNA akkumuliert in Rrm4-abhängigen Partikeln	23
2.5	Cts1 ist in <i>rrm4Δ</i> -Filamenten in der Membran-assoziierten Proteinfraction stark angereichert	26
2.6	Cts1G lokalisiert in der subapikalen Wachstumszone der Filamente	27
2.7	Die Sekretion von Cts1 ist vom Mikrotubuli-abhängigen Rrm4-Transport abhängig	29
2.8	Charakterisierung der mitochondrialen Proteine Afg3, Nuo2 und Atp4	32
2.9	Lokalisationsstudie der putativen Mitochondrien-Proteine Afg3, Nuo2 und Atp4	34

2.10	Das Protein Afg3 ist in Mitochondrien von <i>rrm4Δ</i> -Filamenten höher exprimiert	40
2.11	Die <i>rrm4</i> -Deletion führt in Filamenten zu einer Erhöhung der reaktiven Sauerstoffproduktion in Mitochondrien	42
2.12	Charakterisierung und Lokalisation des ribosomalen Proteins Rps19	46
2.13	Komplementation von Pab1 in <i>S. cerevisiae</i>	48
2.14	Lokalisation des Poly-(A)-bindenden Proteins Pab1 in Partikeln	50
2.15	Rrm4 und Pab1 kolokalisieren	52
3	Diskussion	53
3.1	Die Rrm4-abhängige Sekretion der Endochitinase Cts1	54
3.2	Rrm4 und die Biogenese von Mitochondrien	58
3.3	Das ribosomalen Proteins Rps19 mit extra-ribosomalem Potential	63
3.4	Rrm4 bildet die Haupttransporteinheit für mRNA-Longstreckentransport in Filamenten	66
3.5	Modellvorstellung	67
3.6	Ausblick	70
4	Material und Methoden	71
4.1	Materialien und Bezugsquellen	71
4.1.1	Lösungen, Medien, Enzyme, Kits und Chemikalien	71
4.1.2	Oligonukleotide	74
4.1.3	Plasmide und Plasmidkonstruktionen	75
4.1.4	Stämme	78
4.2	Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden	80
4.2.1	Arbeiten mit <i>E. coli</i>	80
4.2.2	Arbeiten mit <i>U. maydis</i>	81
4.3	Molekularbiologische Standard-Methoden	83
4.3.1	Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren	83
4.3.2	Die Isolierung von Nukleinsäuren	84
4.3.3	Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren	84
4.3.4	Sequenz- und Strukturanalyse	87
4.3.5	PCR-Techniken	87

4.4	Protein-Analysen	88
4.4.1	Präparation der Proben für die 2D-SDS-PAGE und Western-Analyse	88
4.4.2	Präparation von Mitochondrien	88
4.4.3	Nachweis von immobilisierten Proteinen (Western-Analyse)	88
4.4.4	2D-SDS-PAGE	89
4.4.5	Protein Identifizierung mit LC-MS/MS	90
4.5	Phylogenetische Analyse von Endochitinasen	90
4.6	Nachweis von RNA in situ (FISH-Analysen)	91
4.6.1	Fixierung und Vorbereitung der Filamente	91
4.6.2	in situ-Hybridisierung	92
4.7	Maximaquantifizierung mit PIA	93
5	Literaturverzeichnis	94
6	Anhang	106
6.1	Tabelle A1: Identifizierung von Proteinen mit LC-MS/MS	106
6.2	Filme	107

1 Einleitung

1.1 Der Modellorganismus *Ustilago maydis*

Der Basidiomycet *Ustilago maydis*, Erreger des Maisbeulenbrandes, dient seit Jahrzehnten als Forschungsobjekt für detaillierte Analysen der Interaktion des Pilzes mit seiner Wirtspflanze. Ein essentieller Bestandteil der pathogenen Entwicklung bildet der morphologische Differenzierungsprozess zum polar auswachsenden Filament, dessen molekularbiologische Regulation ebenfalls intensiver Forschung unterliegt (Bölker, 2001; Brefort *et al.*, 2009; Feldbrügge *et al.*, 2004; Kahmann & Kämper, 2004).

Der diphasische Lebenszyklus von *U. maydis* unterteilt sich in eine saprophytische Phase, außerhalb der Wirtspflanze, und in eine biotrophe Wachstumsphase. Während der saprophytischen Lebensphase vermehren sich die haploiden Sporidien durch Knospung, welche als einzelne, zigarrenförmige Zellen vorliegen. Durch die Paarung zweier kompatibler haploider Sporidien wird die sexuelle und pathogene Entwicklung des Pilzes eingeleitet. Dieser Morphologiewechsel steht unter der Kontrolle der beiden Paarungstyploci *a* und *b* (Bölker, 2001; Feldbrügge *et al.*, 2006). Das vom bi-allelischen *a*-Locus kodierte Pheromon und der Pheromonrezeptor können jeweils von den entsprechenden Komponenten des kompatiblen *a*-Allels erkannt bzw. stimuliert werden (Bölker *et al.*, 1992). Durch die gegenseitige Pheromonperzeption kommt es zur Konjugationshyphenbildung der haploiden Sporidien, welche sich durch ein gerichtetes Auswachsen entlang des Pheromongradienten mit anschließender Fusion der kompatiblen Zellen an deren Spitzen äußert (Snetselaar & Mims, 1993). Im Anschluss bildet sich ein dikaryotisches Filament aus, wenn die beiden fusionierten Partner zusätzlich kompatibel im multiallelischen *b*-Locus sind. Der *b*-Locus kodiert für zwei Homeodomänen Proteine, bEast (bE) und bWest (bW), welche sich zu einen heterodimeren Komplex zusammenlagern und als essentieller Transkriptionsfaktor die Einleitung und Aufrechterhaltung des Filaments regulieren (Gillissen *et al.*, 1992; Heimel *et al.*, 2010; Kämper *et al.*, 1995).

Durch gerichtetes, unipolares Spitzenwachstum kommt es zur raschen Ausbildung der dikaryotischen Filamente. Diese besitzen eine definierte Polaritätsachse, welche durch apikales Spitzenwachstum und die basale Akkumulation von Vakuolen gekennzeichnet ist. Im späteren Verlauf entwickeln sich die basalen Vakuolen durch Einzug von Septen zu leeren Abschnitten (Lehmlier *et al.*, 1997; Steinberg *et al.*, 1998). Findet dieser morphologische Differenzierungsprozess auf der Wirtsoberfläche statt, kommt es unter

Ausformung von Appressorien ähnlichen Strukturen zur Penetration der Maispflanze. Nach der Penetration der pflanzlichen Zellwand wachsen *U. maydis* Hyphen zunächst intrazellulär in der Maisepidermis, dabei wird die Zytoplasmamembran der Wirtszelle invaginiert und umgibt die Pilzhypen schlauchartig (Döhlemann *et al.*, 2009; Snetselaar, 1993).

Innerhalb der Pflanze wächst das dikaryotische Filament überwiegend intrazellulär in Form eines sich stark verzweigenden Myzels. Die Induktion der Tumore beginnt unter Laborbedingungen etwa vier Tage nach Infektion und ist gekennzeichnet durch eine verstärkte Verzweigung und Proliferation der Pilzhypen im Apoplasten (Snetselaar & Mims, 1994). Im weiteren Verlauf bilden sich innerhalb von sechs bis zwölf Tagen große Pilzaggregate in den zellfreien Bereichen des Mesophyllgewebes aus (Döhlemann *et al.*, 2008b). Die Ausbildung der Tumore beruht auf einer Vergrößerung der Pflanzenzellen sowie mitotischen Teilungen, die vermutlich durch Eingriffe in den Phytohormonhaushalt der Pflanze durch *U. maydis* induziert werden (Döhlemann *et al.*, 2008a; Kämper *et al.*, 2006; Reineke *et al.*, 2008). Durch Proliferation des Myzels kommt es zur Ausbildung von Pflanzengallen, in denen sich nach der Kernfusion die diploiden, sporogenen Hyphen zu Teliosporen differenzieren (Döhlemann *et al.*, 2008b; Döhlemann *et al.*, 2008c; Snetselaar & Mims, 1992; Snetselaar & Mims, 1993). Die Karyogamie erfolgt im Tumorgewebe, dabei fragmentieren die Pilzhypen, runden sich ab und differenzieren sich zu diploiden Teliosporen (Banuett, 1995; Banuett & Herskowitz, 1996; Kahmann *et al.*, 2000; Snetselaar & Mims, 1994). Die Teliosporen sind wegen starker Melanin-Einlagerung schwarz, wodurch der Name Maisbeulenbrand geprägt wurde. Die Sporen werden nach Freisetzung durch Wind, Regen und Tiere verbreitet. In geeigneter, feuchter Umgebung wird in den Sporen die Meiose induziert und es entstehen haploide Sporidien, so dass der Lebenszyklus geschlossen wird (Christensen, 1963; Kahmann *et al.*, 2000).

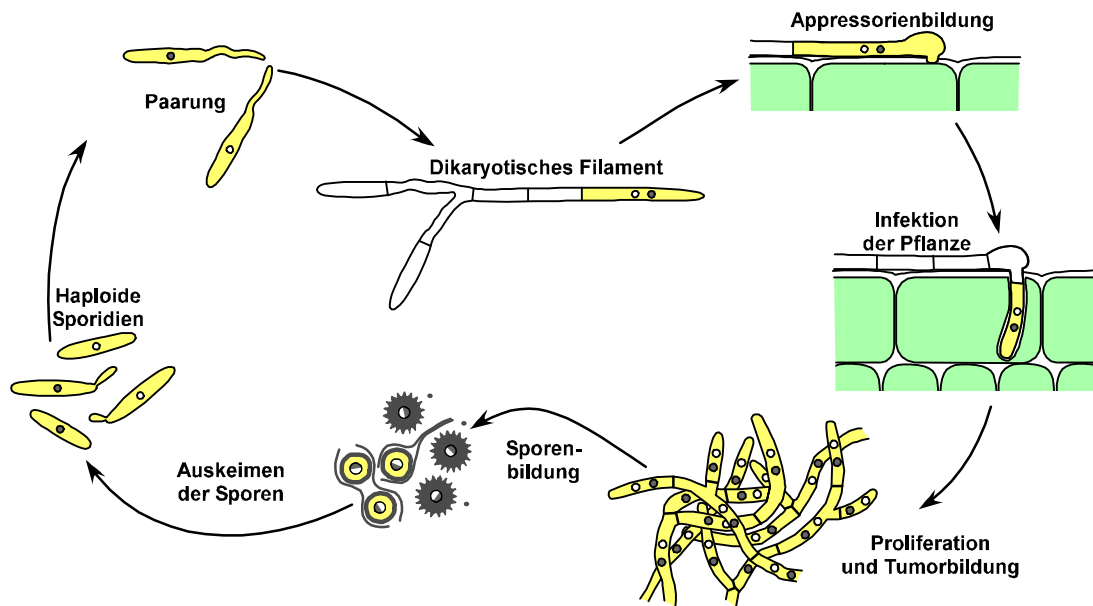


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Lebenszyklus von *U. maydis*. Außerhalb der Pflanze können sich die haploiden Sporidien durch Knospung vermehren. Unter den entsprechenden Umweltbedingungen bilden sich Konjugationshyphen aus und es kommt zur Paarung der kompatiblen Zellen. Dies führt zum Morphologiewechsel und zur Entstehung des b-abhängigen dikaryotischen Filaments. Auf der Pflanzenoberfläche bildet der Pilz Appressorien aus, mit deren Hilfe das Filament in die Pflanze eindringt. Nach der Infektion proliferiert das Myzel und sogenannte Tumore (Pflanzengallen) entstehen. In diesen werden Sporen gebildet, die durch Aufplatzen des Pflanzengewebes freigesetzt werden. Diese können unter geeigneten Bedingungen auskeimen und nach den meiotischen Teilungen entstehen erneut haploide Sporidien (Abbildung modifiziert nach Kämper *et al.*, 2006)

Ein aktuelles Forschungsgebiet stellt die biotrophe Interaktion mit der Wirtspflanze dar. Die genomische Sequenz von *U. maydis* kodiert nur für sehr wenige Pflanzenzellwand-abbauende Enzyme (Kämper *et al.*, 2006). Dies ist in Übereinstimmung mit seiner biotrophen Lebensweise in der die Wirtszellen nicht abgetötet werden. Dennoch beinhaltet das Genom eine Vielzahl an sekretierten, neuartigen Effektoren, welche häufig in sogenannten *Genclustern* angeordnet sind (Kämper *et al.*, 2006; Müller *et al.*, 2008). Während der biotrophen Entwicklung werden die meisten dieser Gene, kodierend für sekretierte Effektor-Proteine, hochreguliert. Die Deletion von einem dieser Cluster führt zu einer erhöhten Virulenz des Pilzes. Zusätzlich resultieren Deletionen von vier weiteren Clustern in verringerter Virulenz und weisen Defekte in unterschiedlichen Stadien der pathogenen Entwicklung auf (Kämper *et al.*, 2006). Dabei ist noch ungeklärt, ob die Effektoren dem Schutz der Pilzhypen in der Pflanze dienen oder die Wirtsabwehr supprimieren (Brefort *et al.*, 2009). Ein weiteres sekretiertes Effektorprotein, Pep1 (*protein essential during penetration 1*), ist wichtig für die Penetration der Epidermiszellen. Der Verlust von Pep1 führt dementsprechend zu einem Defekt in der Penetration und löst eine starke Pflanzenabwehr aus (Döhlemann *et al.*, 2009). Die Charakterisierung dieser

Effektorproteine mit dem Ziel der Identifizierung der Funktion dieser Effektoren bilden einen Hauptaspekt der *U. maydis*-Forschung.

Neben seiner Eigenschaft als phytopathogener Pilz hat sich *U. maydis* in den letzten Jahrzehnten zu einem Modellorganismus etabliert, an dem durch mikrobiologische, genetische, biochemische, zellbiologische und bioinformatische Analysen Grundlagen der Molekularbiologie studiert werden können. Dazu gehören fundamentale zelluläre Prozesse, wie z. B. Genomstabilität und Reparaturmechanismen, Signaltransduktion, Regulation des Zellzyklus, mitochondriale Vererbung, das Zytoskelett sowie Vesikel- und mRNA-Transport (Basse & Steinberg, 2004; Becht *et al.*, 2006; Feldbrügge *et al.*, 2004; Holliday, 2004; Kahmann & Kämper, 2004; König *et al.*, 2009). Zur Analyse der biotrophen Phase kann durch eine künstliche Infektion von Maiskeimlingen die Proliferation des Pilzmyzels und die Bildung der Teliosporen beobachtet werden (Bölker, 2001). Hierfür wurden solopathogene, haploide Stämme generiert, welche durch die Expression eines aktiven b-Heterodimers in der Lage sind die Pflanze ohne vorherige Paarung zu infizieren (Bölker *et al.*, 1995). Für detaillierte Analysen in der Filamententwicklung wird der Stamm AB33 verwendet, mit dem man die Paarung haploider Sporidien umgehen kann. Dieser Laborstamm exprimiert ein aktives bE/bW-Heterodimer unter Kontrolle des Nitrat-induzierbaren Promotors P_{nar} , welcher eine Induktion der Filamentbildung über die Stickstoffquelle im Medium erlaubt (Brachmann *et al.*, 2001). Das daraus resultierende Filament besitzt im Gegensatz zum natürlich vorkommenden dikaryotischen Filament nur einen Kern, weist jedoch das typische unipolare Spitzenwachstum mit am distalen Zellpol durch eingezogene Septen entstehenden leeren Abschnitten auf (Brachmann *et al.*, 2001; Schuchardt *et al.*, 2005). Für die Konstruktion solcher Stämme und zur Funktionsanalyse weiterer Gene stehen für *U. maydis* mittlerweile eine Anzahl von Resistenzmarkern, Promotoren und verschiedenste N- und C-terminale Fusionsproteine in Kassettsystemen zur Verfügung (Brachmann *et al.*, 2004; Kämper, 2004). Durch die vollständige Sequenzierung und manuelle Annotation des Genoms von *U. maydis* sind bioinformatische Ansätze möglich und können in Kombination mit revers genetischen Analysen experimentell weitergeführt werden (MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>; Kämper *et al.*, 2006).

1.2 Polares Wachstum in filamentösen Pilzen

Eine Grundvoraussetzung für Filamentbildung in Pilzen ist die Fähigkeit zu hochgradig polarisiertem Zellwachstum. Filamentöse Pilze sind neben Pollenschläuchen und Neuronen die einzigen bisher analysierten eukaryontischen Zellen, die zu solchem ausgeprägten polarisierten Wachstum fähig sind (Harris, 2006). Die Ausbildung und Aufrechterhaltung der definierten Polaritätsachse gibt dem filamentösen Pilz seine charakteristische Morphologie. Die Filamente expandieren an ihrem apikalen Pol und bilden Septen am distalen Pol aus, welche als molekulare Barriere fungieren (Fischer *et al.*, 2008; Harris, 2006; Steinberg, 2007).

Bedeutende makromolekulare Strukturen des polaren Wachstums bilden der Spitzenkörper und das angrenzende Polarisom, welches die Polaritätsfaktoren beinhaltet und an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist (Sharpless & Harris, 2002). Der Spitzenkörper dient als Nachschubplattform für Vesikel und ist für die gerichtete Sekretion während des Wachstums verantwortlich, wobei seine Position mit der Wachstumsrichtung der Hyphse korreliert. Er befindet sich direkt in der apikalen Wachstumskegel und enthält sowohl exozytotische wie endozytotische Vesikel (Gierz & Bartnicki-Garcia, 2001; Harris *et al.*, 2005). Für das Wachstum benötigte Enzyme und Zellwandmaterial werden in spezialisierten Vesikeln, wie z. B. den Chitosomen, über Langstreckentransport dem Spitzenkörper zugeführt. (Bartnicki-Garcia, 2006; Riquelme *et al.*, 2007). Des Weiteren müssen für die Aufrechterhaltung der Polaritätsachse auch Signal- und Landmarkenproteine zur Hyphenspitze transportiert werden (Harris, 2006; Steinberg, 2007).

Ein entscheidender Aspekt des polaren Wachstums ist der aktive Lang- und Kurzstreckentransport durch die molekularen Motoren Kinesin, Dynein und Myosin, entlang des Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskeletts. Das Zytoskelett bildet ein hoch geordnetes Netzwerk aus und steht in Verbindung mit den Protein-Komplexen an der Hyphenspitze. Das Aktin-Zytoskelett ist essentiell für polares Wachstum, wohingegen das Mikrotubuli-Zytoskelett eher eine Rolle bei der Richtung und Geschwindigkeit spielt (Fischer *et al.*, 2008; Harris, 2006; Riquelme *et al.*, 2007; Steinberg, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust des Mikrotubuli-Zytoskeletts zu einer Destabilisierung der Position des Spitzenkörpers führt, was sich phänotypisch in einer abnormalen Filamentbildung äußert. Damit in Übereinstimmung führt in *Aspergillus nidulans* die Deletion des konventionellen Kinesin-kodierenden Gens *kinA* zu einer signifikanten Reduktion des filamentösen Wachstums (Requena *et al.*, 2001; Seiler *et al.*, 1997). Diese Beobachtungen konnten in *U. maydis* bestätigt werden, da auch hier eine Beteiligung des

Zytoskeletts mit assoziierten molekularen Motoren der Endozytose sowie Signalproteinen am polaren Wachstum nachgewiesen werden konnte. Die Abwesenheit des konventionellen Kinesins Kin1 führt zu verkürzten Filamenten und zu einer gesteigerten Anzahl an bipolar auswachsenden Hyphen (Fuchs *et al.*, 2005; Schuchardt *et al.*, 2005; Wedlich-Söldner *et al.*, 2000). Zusätzlich konnte hier zum ersten Mal in einem Pilz eine Beteiligung des mRNA-Longstreckentransportes an dem Morphologiewechsel zum Filament nachgewiesen werden (König *et al.*, 2009).

1.3 mRNA-Transport und lokale Translation in höheren Eukaryonten

Die Polarisierung und funktionelle Kompartimentierung sind wesentliche Bestandteile der Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse einer funktionsfähigen Eukaryontenzelle. Hierfür ist es notwendig, die verschiedensten Bestandteile einer Zelle zu definierten zytoplasmatischen Kompartimenten, Organellen und Membranbereichen zu sortieren. Auf diese Weise können in diesen subzellulären Bereichen spezialisierte biologische und regulatorische Zellfunktionen ausgeübt werden (Nelson *et al.*, 2003). Dabei ist ein effizienter Mechanismus die lokale Translation nach mRNA-Lokalisation, die eine örtliche und zeitliche Regulation der Proteinexpression gewährleistet. Hierdurch kann eine subzelluläre Fehllokalisation von Proteinen verhindert werden (Becalska & Gavis, 2009; Holt & Bullock, 2009). Eine Vielzahl an verschiedenen biologischen Funktionen beruht auf den unterschiedlichsten molekularen Mechanismen der mRNA-Lokalisation (St Johnston, 2005). Meistens liegt der mRNA-Lokalisation ein aktiver mRNA-Transport zu Grunde, wobei der Transport entlang des Aktin- oder Mikrotubuli-Zytoskeletts erfolgt und dementsprechend als Kurz- oder Longstreckentransport bezeichnet wird. Die dabei transportierten mRNAs besitzen *cis*-aktive Elemente, welche die Information für den Transport beinhalten. Diese Sequenzen werden von RNA-bindenden Proteinen erkannt und gebunden (Jambhekar & DeRisi, 2007). Durch die Zusammenlagerung von mRNAs, RNA-bindenden Proteinen und assoziierten Faktoren entstehen große Boten-Ribonukleoprotein-Komplexe, sogenannte mRNPs (Jansen, 2001; St Johnston, 2005). Mittels Adapterproteinen werden die mRNPs mit molekularen Motoren verknüpft und aktiv entlang des Zytoskeletts zum Bestimmungsort transportiert (Tekotte & Davis, 2002; Vale, 2003). Während des Transportprozesses wird die Translation häufig durch Translationsinhibitoren unterdrückt. Nach Ankunft der mRNPs am Bestimmungsort wird die mRNA abgeladen, verankert und die Inhibierung der Translation durch lokale Kinasen aufgehoben (Hüttelmaier *et al.*, 2005; Paquin & Chartrand, 2008).

In höheren Eukaryonten dienen migrierende Zellen als gute Modellsysteme zur Untersuchung des aktiven Aktin-abhängigen mRNA-Transports (Rodriguez *et al.*, 2008). Die Lokalisation von β -Aktin-mRNA in Lamellipodien von Fibroblasten führt zu lokaler Aktin-Polymerisation, Zellpolarität und gerichteter Bewegung (Condeelis & Singer, 2005). Das *cis*-aktive Lokalisationselement befindet sich in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) und ist für die Lokalisation der β -Aktin-mRNA essentiell (Kislauskis *et al.*, 1993). Das RNA-bindenden Protein ZBP1 (*zipcode-binding protein 1*) wird für den Transport benötigt (Ross *et al.*, 1997) und inhibiert gleichzeitig die Translation (Hüttelmaier *et al.*, 2005). Durch die lokale Phosphorylierung von ZBP1 durch die Kinase Src wird die Repression der Translation aufgehoben (Hüttelmaier *et al.*, 2005). Entsprechend konnte eine überwiegend lokale Translation am Bestimmungsort nachgewiesen werden (Rodriguez *et al.*, 2006). Die β -Aktin-mRNA ist nicht das einzige lokalisierende Transkript in migrierenden Zellen. Es konnten verschiedene mRNAs, kodierend für Motilitätsproteine, mit der Konsensus-Sequenz des β -Aktin-Lokalisationselementes identifiziert werden (Shestakova *et al.*, 2001).

Der aktive Transport entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts gehört zu den am häufigsten vorkommenden mRNA-Transportmechanismen und wird durch die molekularen Motoren Kinesin und Dynein vermittelt, wobei Kinesin hauptsächlich zum Plus-Ende und Dynein zum Minus-Ende der polarisierten Mikrotubuli transportieren (Hirokawa & Noda, 2008; Tekotte & Davis, 2002). Es konnte anhand einer hoch-auflösenden FISH-Analyse (*high-resolution fluorescent in situ hybridization*) gezeigt werden, dass während der frühen Embryogenese des Modellorganismus *Drosophila melanogaster* 71% der exprimierten mRNAs eine distinkte subzelluläre Lokalisation aufweisen (Lecuyer *et al.*, 2007). Intensive Analysen der vier Transkripte *gurken* (*grk*), *bicoid* (*bcd*), *oskar* (*osk*) und *nanos* (*nos*) ergaben neue Erkenntnisse nicht nur über den Mechanismus der mRNA-Lokalisation, sondern auch über die Entstehung entwicklungsspezifischer Asymmetrien (Becalska & Gavis, 2009). Die Körperachsen des Embryos werden schon während der Oogenese angelegt, wobei mRNA-Lokalisation und Translationskontrolle essentielle Funktionen einnehmen (Johnstone & Lasko, 2001; Riechmann & Ephrussi, 2001). Zur Ausbildung der anterior-posterior Körperachse lokalisieren die *bcd*-mRNA anterior und *osk*- und *nos*-mRNAs posterior in der Oozyte (St Johnston, 2005) (Becalska & Gavis, 2009). Der aktive Transport der *osk*-mRNA entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts wird über Khc1, die schwere Kette des Kinesins, vermittelt (Clark *et al.*, 1994; St Johnston, 2005). Dabei konnte in Oozyten beobachtet werden, dass die *osk*-mRNA in kleinen zytoplasmatischen Partikeln akkumuliert und manche mittels Khc1 entlang der Mikrotubuli transportiert werden. Diese

mRNPs bewegen sich allerdings in alle Richtungen mit einer schwachen Tendenz in Richtung posterior. Dieses Ergebnis widerspricht der postulierten Modellvorstellung von hoch-polarisierten Mikrotubuli mit konzentrierten Minus-Enden anterior und Plus-Enden posterior, d.h. das Mikrotubuli-Zytoskelett scheint nicht so stark polariert zu sein wie bisher angenommen (St Johnston, 2005; Steinhauer & Kalderon, 2006; Zimyanin *et al.*, 2008). Dennoch könnte es sich auch um einen indirekten Zusammenhang zwischen Khc1 und der Lokalisation der *osk*-mRNA handeln, da Kinesin für die posterior Lokalisation von Dynein zuständig ist (Brendza *et al.*, 2002; Palacios & St Johnston, 2002). Mehrere Faktoren sind an der asymmetrischen Lokalisation der *osk*-mRNA beteiligt, wie z. B. die hnRNP-Proteine Hrp48, Squid (Sqd) und Glorund (Glo) (Huynh *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2003; Zimyanin *et al.*, 2008). Eine Vielzahl an molekularen Funktionen werden von unterschiedlichen hnRNP-Proteinen ausgeführt, wobei diese meistens sehr dynamisch mit mRNAs assoziiert sind (Dreyfuss *et al.*, 2002). Des Weiteren ist der *exon-junction complex* (EJC) wichtig. Dieser besteht aus den Proteinen Mago nashi, Y14, eIF4AIII und Barentz. Mutationen in diesen Komponenten führen zur Mislokalisierung der *osk*-mRNA (Hachet & Ephrussi, 2001; Palacios *et al.*, 2004). Der EJC wird während des Spleißens rekrutiert und markiert die gespleißte Stelle der mRNA. Für die *osk*-mRNA wurde gezeigt, dass das erste Intron wichtig für die posterior Lokalisation der Transkripte ist (Hachet & Ephrussi, 2004). Außerdem ist das dsRNA (Doppelstrang-RNA)-bindende Protein Stau (Stau) während der ganzen Oogenese mit der *osk*-mRNA assoziiert (Jenny *et al.*, 2006; St Johnston *et al.*, 1991) und wird für deren Translations-Aktivierung und Verankerung am posterioren Pol benötigt (Micklem *et al.*, 2000). D. h. die dynamische und zeitliche Abfolge der Zusammensetzung von mRNP-Komplexen, geprägt durch Spleiß-, Kernexport-, Lokalisierungs- und Translationsfaktoren, ist die Voraussetzung für die spätere Lokalisation der Ziel-mRNA (Moore, 2005; Tange *et al.*, 2004). Interessanterweise weist der Mikrotubuli-abhängige mRNA-Transport in Neuronen denselben Mechanismus auf, wobei die lokale Translation einen wichtigen Bestandteil für das Wachstum von Axonen während der Neuronenentwicklung, der Synapsenentstehung und auch in ausgereiften Neuronen darstellt (Lin & Holt, 2007). Diese Beispiele demonstrieren die Komplexität des aktiven mRNA-Kurz- und Lang-Streckentransportes. Basierend auf der Bedeutsamkeit dieses Mechanismus während der Entwicklung und Zelldifferenzierung befindet sich dieses Themenfeld weiter im Fokus aktueller Forschung.

1.4 mRNA-Transport in Pilzen

In *Saccharomyces cerevisiae* konnten mehrere Transkripte identifiziert werden, welche über den aktiven mRNA-Transport zur Knospe der Zelle gelangen (Aronov *et al.*, 2007; Shepard *et al.*, 2003), wobei einige zusätzlich in direkter Verbindung mit dem RNA-bindenden Protein She2p identifiziert wurden (Oeffinger *et al.*, 2007). Diese mRNAs kodieren für Proteine mit verschiedensten subzellulären Bestimmungsorten, wie z. B. der Plasmamembran, den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum (ER), dem Zytoplasma oder dem Nukleus (Aronov *et al.*, 2007; Shepard *et al.*, 2003). Die asymmetrische Lokalisation dieser Transkripte konnte jedoch nur für wenige mRNAs mit dem Bestimmungsort und der Funktion des kodierten Proteins in Verbindung gebracht werden. Das am Besten untersuchte Beispiel für aktiven mRNA-Transport ist die *ASH1* (*asymmetric synthesis of HO*)-Lokalisation während des Paarungstyp-Wechsels (Du *et al.*, 2007; Paquin *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2007; Zarnack & Feldbrügge, 2007; Zarnack & Feldbrügge, 2010). Während der Zellteilung akkumuliert das Transkript des Transkriptionsrepressors Ash1p nur im Nukleus der Tochterzelle, wodurch die Expression der HO-Endonuklease reprimiert und der Paarungstyp-Wechsel in der Tochterzelle unterdrückt wird (Takizawa *et al.*, 1997; Long *et al.*, 1997). She2p erkennt als Homodimer vier Lokalisationselemente in der *ASH1*-mRNA, drei in der kodierenden Sequenz und eine im überlappenden Bereich der 3'UTR (Böhl *et al.*, 2000; Chartrand *et al.*, 2002; Long *et al.*, 2000; Niessing *et al.*, 2004). Das Adapter-Protein She3p verbindet She2p samt seiner mRNA-Fracht mit dem Typ-V Myosin Myo4p, dem molekularen Motor dieses Transports (Böhl *et al.*, 2000; Long *et al.*, 2000). Dieser Komplex bestehend aus She2p, She3p und Myo4 wird She-Maschinerie oder auch „*locosome*“ genannt und ist essentiell für die asymmetrische Lokalisierung von allen an der Knospe lokalisierenden Transkripten (Chartrand *et al.*, 2001; Shepard *et al.*, 2003). Während des Transportprozesses wird die Translation der Transkripte inhibiert, wobei die Lokalisationselemente in der *ASH1*-mRNA nicht nur für den Transportprozess, sondern auch für die Regulation der Translation wichtig sind (Gu *et al.*, 2004). Das Zusammenspiel der RNA-bindenden Proteine She2p, Puf6p und Khd1p führt zur Inhibierung der Translation. Die Phosphorylierung von Khd1p durch die Membran-ständige Kinase Yck1p führt zur Reduktion der RNA-bindenden Kapazität von Khd1p (Paquin *et al.*, 2007) und resultiert in der lokalen Translation von *ASH1* (Müller *et al.*, 2007; Paquin & Chartrand, 2008). Interessanterweise gibt es Anhaltspunkt für einen Ko-Transport von lokalisierten mRNAs und dem ER zur Zellspitze (Aronov *et al.*, 2007; Schmid *et al.*, 2006).

Auch in dem humanpathogenen Pilz *Candida albicans* konnte ein She3-abhängiger mRNA Transport charakterisiert werden. Dieser aktive mRNA-Transport entlang des Aktin-Zytoskeletts bringt spezifische Transkripte einerseits zur Tochterzelle, während der Teilung, und andererseits zur Hyphenspitze (Elson *et al.*, 2009; Zarnack & Feldbrügge, 2010). Mittels einer Immunopräzipitation von She3 wurden 31 Transkripte in knospenden Zellen und 38 Transkripte in induzierten Hyphen identifiziert, welche in die zellulären Prozesse Mitose, Dynamik des Zytoskeletts, Zellpolarität, Transkription, molekularer Transport und Regulation, Virulenz und Zellwandstruktur und -funktion eingeordnet werden konnten. Zusätzlich reguliert der She3-abhängige mRNA-Transport während des hefeartigen Wachstums und in Hyphen die asymmetrische Lokalisation der *ASH1*-mRNA (Elson *et al.*, 2009). Diese Analysen deuten daraufhin, dass der Aktin-abhängige mRNA-Transport wichtig für die lokale Expression in Filamenten ist.

1.5 Mikrotubuli-abhängiger mRNA-Transport in *U. maydis*

Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigten, dass für das polare Wachstum von *U. maydis* neben dem Transport von Vesikeln auch der aktive mRNA-Transport eine wichtige Funktion einnimmt. Basierend auf einem revers genetischen Ansatz wurde die Beteiligung des RNA-Erkennungs-Motiv (RRM, *RNA recognition motif*) enthaltende Protein Rrm4 an der Entwicklung zum dikaryotischen Filament aufgedeckt. Die Deletion von *rrm4* resultiert in einem Defekt der Filamentbildung und in einer verringerten Pathogenität des Pilzes (Becht *et al.*, 2005). Die hefeartig wachsenden Sporidien zeigen hingegen keinen veränderten Phänotypen, was auf eine spezifische Funktion von Rrm4 in der posttranskriptionellen Regulation während des filamentösen Wachstums hindeutet (Becht *et al.*, 2005; Feldbrügge *et al.*, 2008). Die Abwesenheit von Rrm4 führt zu Filamenten mit verlangsamtem Spitzenwachstum, welche nicht in der Lage sind, am distalen Pol Septen und damit leere Abschnitte einzufügen, wodurch sie eine verkürzte, gestauchte Morphologie aufweisen. Des Weiteren kommt es zu einer charakteristischen Erhöhung von bipolar auswachsenden Filamenten (Abb.2A).

Rrm4 beinhaltet drei N-terminale RRM-Domänen mit einer für ELAV- (*embryonic lethal abnormal vision*) Proteine typischen Anordnung und eine C-terminale Mademoiselle-Domäne (MLLE, Protein/Protein-Interaktions-Domäne; früher als PABC-Domäne bezeichnet; (Becht *et al.*, 2005). Die RRM-Domäne enthält zwei konservierte Bereiche, RNP1 und RNP2, welche mit der gebundenen RNA in unmittelbarem Kontakt stehen (Maris *et al.*, 2005). Die MLLE-Domäne ist eine kennzeichnende C-terminale Domäne des eukaryotischen Poly-(A)-bindenden Proteins. Sie bildet eine Peptid-Bindetasche aus,

welche für eine direkte Interaktion mit PAM2-Domänen beinhaltenden Proteinen essentiell ist (Kozlov *et al.*, 2004; Kozlov *et al.*, 2010).

Die Analyse der subzellulären Lokalisation von Rrm4 zeigte, dass das Protein in Partikeln akkumuliert, welche bidirektional entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts pendeln (Abb. 2A). Diese Rrm4-beihaltenden Partikel bewegen sich mit hoher Prozessivität zu den Zellpolen, wobei sie die Richtung ohne sichtbare Verzögerung wechseln (Becht *et al.*, 2006). Die MLLE-Domäne ist essentiell für die Bildung und den Transport der fahrenden Partikel, da Mutationen in der Peptid-Bindetasche zum Funktionsverlust von Rrm4 und zur Akkumulation von großen, statischen Partikeln führen. Zusätzlich ist der aktive Transport entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts wichtig für die Funktion, da in Abwesenheit des konventionellen Kinesins Kin1 keine Rrm4-abhängige mRNP-Bewegung stattfindet. Ebenso führt der Verlust der ersten beiden RRM-Domänen zum Funktionsverlust, obwohl die pendelnde Bewegung der Rrm4-abhängige Partikel weiterhin zu beobachten ist (Becht *et al.*, 2006).

Für die Identifizierung möglicher Ziel-RNAs wurde die *in vivo* CLIP-Technologie (CLIP, *ultraviolet crosslinking and immunoprecipitation*) angewendet, wobei durch die Bestrahlung mit UV-Licht in direktem Kontakt zueinander stehende Proteine und Nukleinsäuren kovalent kreuzvernetzt werden (Denman, 2006; Ule *et al.*, 2005; Ule *et al.*, 2003). Mit dieser Methode konnten etwa 50 potentielle Ziel-mRNAs von Rrm4 identifiziert werden, welche für Proteine kodieren, die in den funktionellen Kategorien *Protein synthesis*, *Protein fate*, *Protein with binding function or cofactor requirement*, *Cell fate*, *Development* und *Cell type differentiation* signifikant angereichert waren. Desweiteren konnte ein CA-reiches Motiv als potentielle Bindestelle identifiziert werden (König *et al.*, 2009). Zur Bestätigung der identifizierten Ziel-mRNAs von Rrm4 wurden zwei unabhängige Analysen durchgeführt. Einerseits konnte *in situ* mit einer FISH-Analyse (*fluorescence in situ hybridization*) die Lokalisation der identifizierten *rho3*-mRNA in zytoplasmatischen Partikeln beobachtet werden, wobei die Bildung der Partikel in der Abwesenheit von Rrm4 signifikant reduziert war. Andererseits wurde *in vivo* das λ N-Gfp-Reportersystem angewendet, welches auf der Expression eines heterologen RNA-bindenden Proteins fusioniert mit Gfp und einer Insertion des entsprechenden heterologen RNA-Motivs in das zu untersuchende Transkript basiert (Bertrand *et al.*, 1998; Daigle & Ellenberg, 2007). Mit Hilfe dieses Systems wurden zwei der identifizierten Ziel-mRNAs, *ubi1*- und *rho3*-mRNA, in bidirektional beweglichen Partikeln visualisiert und mit Rrm4 kolokalisiert (König *et al.*, 2009). Zur Kontrolle wurde die *mfa1*-mRNA verwendet, welche

signifikant weniger pendelnde Partikel bildete. Weiterhin ist die 3'UTR der *ubil*-mRNA mit ihrem CA-reichen Motiv ausreichend, um die Anzahl der beweglichen Partikel und die Prozessivität der *mfa1*-mRNA zu steigern. Dementsprechend erfüllt das CA-reiche Motiv die Kriterien einer *cis*-aktiven Sequenz, welche den Rrm4-abhängigen mRNA-Transport vermittelt. Diese Analysen bestätigten, dass Rrm4 für den Mikrotubuli-abhängigen Transport bestimmter Transkripte im Filament verantwortlich ist. Die Funktion dieses aktiven Langstreckentransports bestimmter mRNAs im infektiösen Filament ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

1.6 Proteomanalyse zur Charakterisierung der Funktion von Rrm4 in Filamenten

Zur Aufklärung der Funktion des aktiven Rrm4-abhängigen Transports wurde parallel zu den vorher aufgeführten *in vivo*-Analysen eine differentielle Proteom-Analyse von Wildtyp- und *rrm4Δ*-Filamenten durchgeführt. Für diese Untersuchung wurden acht Stunden induzierte Filamente der Stämme AB33 und AB33rrm4Δ verwendet und anhand einer fraktionierten 2D-SDS-Gelelektrophorese analysiert ((Becht *et al.*, 2006; Brachmann *et al.*, 2001; Diplomarbeit J. Koepke, 2005). In der Membran-assoziierten Proteinfraction wurden in diesen Vorversuchen deutliche Unterschiede detektiert, worauf diese Protein-Fraktion mit der 2D-DIGE-Technologie (*2D Fluorescence Difference Gel Electrophoresis*, GE Healthcare) erneut untersucht wurde. Das Vermischen mehrerer Proben minimiert dieser Technik die Gel-zu-Gel-Varianz und durch den Einsatz eines internen Standards erhöht sich die Genauigkeit der relativen Quantifizierung (Alban *et al.*, 2003; Unlü *et al.*, 1997; Westermeier & Scheibe, 2008). Hierzu wurden die Membran-assoziierten Proteinextrakte aus AB33- und AB33rrm4Δ-Filamenten in jeweils drei biologischen Replikaten kovalent mit den Fluoreszenzfarbstoffen (*CyDyes*) Cy5 und Cy3 nach der Minimalmarkierungs-Methode markiert. Der interne Standard wurde zu gleichen Anteilen aus diesen sechs Proteinextrakten gemischt und mit Cy2 markiert (Gade *et al.*, 2003; Westermeier & Scheibe, 2008). Die Cy2-, Cy3- und Cy5-markierten Proteinproben der biologischen Replikate wurden jeweils in drei unabhängigen Gelen ko-separiert. Bei einer festgelegten Grenze von mindestens 2,5-facher Mengendifferenz (Signifikanzniveau/Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0.01$, Student's t-Test) wurden zehn differentiell exprimierte Protein-Spezies aus ungefähr 600 zugeordneten Protein-Varianten detektiert (*DeCyder 2D Differential Analysis Version 6.0 Software*, GE Healthcare). Die zehn Protein-Spezies zeigten eine 3-15-fache relative Mengendifferenz (Diplomarbeit J. Koepke, 2005; Abb. 2A und B). Für eine massenspektrometrische Analyse zur

Identifizierung der Protein-Spezies wurden präparative 2D-Gele angefertigt, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Deep Purple* (GE Healthcare) angefärbt wurden. In Kooperation mit Prof. Dr. K. Lingelbach und Dr. J. Nyalwidhe (Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Biologie, AG Parasitologie) konnten drei Protein-Spezies identifiziert werden (Diplomarbeit J. Koepke, 2005; Abb. 2B und C; Spezies Nr.1: um1151, *probable RPS19B ribosomal protein S19*; Nr.4 und 6: um10419, *endochitinase Cts1*).

Die Endochitinase Cts1 wurde anhand von zwei Protein-Varianten identifiziert (Abb. 2B und C; Nr. 4 und 6). Beide zeigten eine mehr als drei-fach erhöhte Proteinmenge in der Membran-assoziierten Proteinfraction von *rrm4Δ*-Filamenten. Chitinasen sind degradierende Enzyme und hydrolysieren die β -1,4-glykosidischen Bindungen zwischen den N-Acetyl-D-Glukcosamin Einheiten (2-Acetamido-2-desoxy-D-glucopyranose, GlcNAc) des Chitins. Das unverzweigte Homopolymer Chitin ist neben der Zellulose das verbreitetste Biopolymer der Erde. Chitin bildet den Hauptbestandteil der pilzlichen Zellwand und des Exoskeletts von Athropoden. Die Chitinasen sind in vielen Organismen vertreten, dazu gehören Viren, Bakterien, Pilze, Insekten, Pflanzen und Tiere. Dabei führen diese glykolytischen Enzyme verschiedenste Funktion aus. In Bakterien dienen Chitinasen zur Nutzung von Kohlenhydraten und Energie aus Chitin (Wang & Chang, 1997). Pflanzliche Chitinasen sind beteiligt am Abwehrmechanismus gegen pilzliche Pathogene und sind zusätzlich wichtig für die Entwicklung der Pflanze (Kasprzewska, 2003). Die meisten Pilze kodieren für mehrere Chitinasen. Daher ist die Funktion von Chitinasen in Pilzen ist noch weitestgehend ungeklärt.

Überraschenderweise konnte die höchste Expressionsdifferenz bei einem ribosomal Protein identifiziert werden (Abb. 2B und C; Nr. 1). Das ribosomale Protein Rps19 gehört zur 40S Untereinheit des Ribosoms. Die hier detektierte 15-fache Anreicherung von Rps19 in der Membran-assoziierten Proteinfraction könnte auf eine extra-ribosomale Funktion dieses Proteins hindeuten.

In der differentiellen Proteom-Analyse konnte durch die Abwesenheit von Rrm4 ein Expressionsunterschied von 6% der in dieser Fraktion detektierten Protein-Spezies erkannt werden. Folglich könnte die Identifizierung der restlichen Protein-Kandidaten weitere Hinweise zur Funktion des Rrm4-abhängigen mRNA-Transportes und zur Aufklärung des *rrm4Δ*-Phänotyps beitragen.

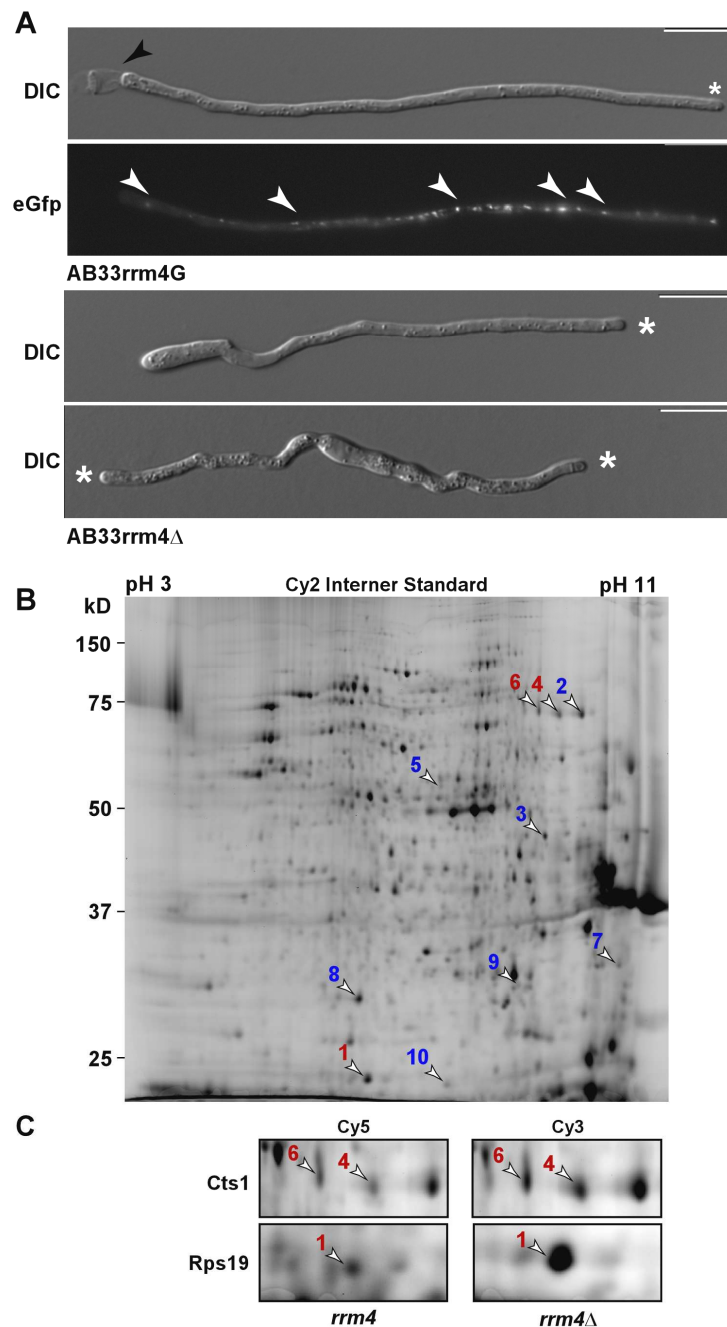


Abbildung 2: Die 2D-DIGE-Proteom-Analyse identifiziert zehn Protein-Varianten mit veränderter Protein-Menge in *rrm4Δ*-Filamenten. (A) Die Deletion von *rrm4* führt zu gestörtem filamentösem Wachstum. Darstellung von DIC- (*differential interference contrast*) und Fluoreszenzaufnahmen von acht Stunden induzierten Filamenten der Stämme AB33rrm4G und AB33rrm4Δ. Diese Stämme exprimieren Rrm4 C-terminal fusioniert mit eGfp oder beinhalten eine Deletion von *rrm4*. Der schwarze Pfeil markiert die leeren Abschnitte mit eingezogenem Septum, und die weißen Pfeile zeigen Rrm4-beinhaltende mRNPs an. Die Wachstumszone der Hyphen ist mit Sternchen markiert. Größenmaßstab = 10 μ m. (B) Das Cy2-Bild der DIGE-Analyse repräsentiert den internen Standard der Membran-assoziierten Proteinfraktion (Größenmarker auf der linken Seite, pH-Gradient oben). Die mit nummerierten Pfeilen versehenen zehn Protein-Varianten zeigen einen mehr als 2,5-fachen Unterschied in der Proteinmenge auf. Die rot dargestellten Protein-Varianten 1, 4 und 6 wurden im Vorfeld dieser Arbeit bereits identifiziert (siehe Diplomarbeit J. Koepke, 2005). (C) Darstellung von vergrößerten Gelausschnitten eines Cy5- und Cy3-Bildes der DIGE-Analyse. Markierung der als Endochitinase Cts1 und des ribosomalen Proteins, Rps19, identifizierten Protein-Varianten Nr. 1, 4 und 6 (siehe Diplomarbeit J. Koepke, 2005).

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Das RNA-bindende Protein Rrm4 vermittelt den Mikrotubuli-abhängigen Transport bestimmter Transkripte im infektiösen Filament von *U. maydis*. Dieser Rrm4-abhängige Langstreckentransport ist an der Ausbildung der Polaritätsachse beteiligt, und der Verlust von Rrm4 führt zu beeinträchtigter Filamentbildung und reduzierter Virulenz. Der differentielle Proteom-Ansatz im Vorfeld dieser Arbeit lieferte erste Eindrücke in die molekularen Ursachen des *rrm4Δ*-Phänotyps. Den Schwerpunkt dieser Arbeit bildete die Bestätigung der beiden identifizierten Protein-Varianten der Endochitinase Cts1 mit anschließender zellbiologischer Charakterisierung, wobei die subzelluläre Lokalisation und eine Funktionsanalyse die Verbindung zu Rrm4 und der damit verbundenen Filamentbildung klären sollten. Folglich könnte es sich bei der *cts1*-mRNA um ein direktes Ziel-Transkript dieses mRNA-Langstreckentransportprozesses handeln, deren lokale Translation für die Sekretion und die damit verbundene Hyphenmorphologie wichtig sein könnte. Hier könnte eine Lokalisierung der *cts1*-mRNA mittels FISH-Analyse und eine Lokalisationsanalyse des kodierenden Proteins Aufschluss über eine direkte Verbindung mit Rrm4 ergeben. Des Weiteren sollten diese Analysen die Erhöhung der Proteinmenge von Cts1 in *rrm4Δ*-Filamenten auklären.

Die starke Erhöhung des ribosomalen Proteins Rps19 deutet auf eine extra-ribosomale Funktion des Proteins hin. Dementsprechend konnte Rps19 mit der humanen Erkrankung der Diamond-Blackfan-Anämie (DBA) in Verbindung gebracht werden. Es konnte gezeigt werden, dass Rps19 wichtig für frühe hämatopoetischen Zelldifferenzierungen ist, wobei die eigentliche Funktion noch weitestgehend unaufgeklärt ist (Flygare *et al.*, 2004). Eine zellbiologische Analyse von Rps19 könnte erste Hinweise für eine Membran-ständige Funktion liefern.

Zusätzlich sollte die Identifizierung der verbleibenden differentiell exprimierten Protein-Varianten erfolgen. Des Weiteren sollten im Rahmen dieser Arbeit das putative Poly-(A)-bindende Protein in einer Hefe-Komplementationsanalyse als solches bestätigt und damit funktionell von Rrm4 abgegrenzt werden. Basierend auf der Annahme, dass das Poly-(A)-bindende Protein an den Poly-(A)-Anhang der 3'UTR vieler, wenn nicht aller, eukaryotischer mRNAs bindet sollte anhand einer Fusion mit Fluoreszenzproteinen die Lokalisation von Pab1 in Wildtyp- und *rrm4Δ*-Filamenten weitere Einblicke in den mRNA-Transportprozess eröffnen.

2 Ergebnisse

2.1 Identifizierung der differentiell exprimierten Protein-Spezies

Zur weitergehenden Identifizierung der differentiell exprimierten Protein-Spezies aus der DIGE-Analyse wurden präparative 2D-Gele der Membran-assoziierten Proteinfraction angefertigt (Diplomarbeit J. Koepke, 2005; Herstellung siehe Material und Methoden). Diese Proteinfraction wurde unter den gleichen Bedingungen wie in der DIGE-Analyse behandelt und aufgetrennt. Die isoelektrische Fokussierung wurde demnach mit einem immobilisierten pH-Gradienten in einem nicht-linearen Bereich von pH 3 bis pH 11 durchgeführt (Bjellqvist *et al.*, 1982). Die Auftrennung erfolgte anhand einer 10%igen SDS-PAGE. Anschließend wurde mit dem fluoreszierenden Farbstoff *Deep Purple* gefärbt (GE Healthcare). Die mit Hilfe der *DeCyderTM Software* (GE Healthcare) zugeordneten Protein-Spezies wurden aus dem 2D-Gel herausgestanzt und in Kooperation mit Dr. Florian Kaffarnik anhand einer LC-ESI-MS/MS-Analyse identifiziert (LTQ, Thermo Scientific, Hemel Hempstead, U. K.; siehe Anhang, Material und Methoden). Es konnten sieben Protein-Spezies zugeordnet und identifiziert werden (Tabelle 1). Die drei schon bekannten Protein-Spezies (Diplomarbeit J. Koepke, 2005; Spezies Nr.1: um1151, *probable RPS19B ribosomal protein S19*; Nr.4 und 6: um10419, *endochitinase Cts1*; Tabelle 1) wurden bestätigt. Protein-Spezies Nr.2 wurde ebenfalls als eine Protein-Variante der Endochitinase Cts1 identifiziert. Weiterhin wurden die Protein-Spezies Nr.3, 8 und 10 als putative mitochondrielle Proteine identifiziert. (Tabelle 1; Afg3-Protease, Atp4 aus Komplex V und Nuo2 aus Komplex I).

Demnach konnten in *rrm4Δ*-Filamenten, im Vergleich zum Wildtyp-Filament, drei posttranslational modifizierte Protein-Varianten der Endochitinase Cts1 (Nr. 3, 4 und 6) mit drei- bis fünf-facher Erhöhung, das ribosomale Protein Rps19 (Nr. 1) mit 15-facher Erhöhung und die mitochondrielle Protease Afg3 (Nr. 3) mit einer fünf-fachen erhöhten Proteinmenge in der Membran-assoziierten Proteinfraction identifiziert werden. Im Gegensatz dazu war die relative Proteinmenge der Untereinheiten Nuo2 (Nr. 8) sechs-fach und Atp4 (Nr. 10) drei-fach in *rrm4Δ*-Filamenten reduziert (Tabelle 1). Zusammenfassend ergab diese differentielle Proteom-Analyse einen Rrm4-abhängigen Expressionsunterschied von spezifischen Proteinen, welche an zellulären Prozessen wie Translation, Mitochondrien-Funktion und Zellwandumbau beteiligt sind. Die drei anderen differentiell exprimierten Protein-Varianten (Nr. 5, 7 und 9; Abb. 3A) konnten entweder in den präparativen 2D-Gelen nicht zugeordnet oder mittels massenspektrometrischer Analyse

nicht eindeutig identifiziert werden. Die identifizierten Kandidaten-Proteine wurden im Verlauf dieser Arbeit genauer analysiert.

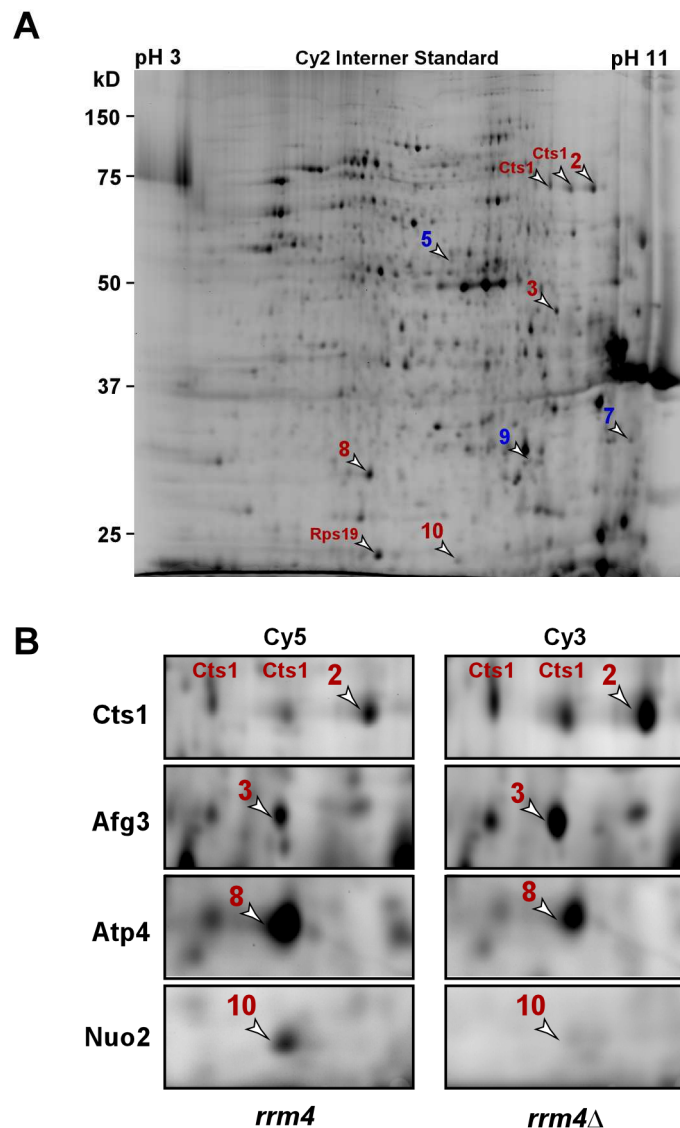


Abbildung 3: Die 2D-DIGE-Proteom-Analyse identifiziert zehn Protein-Varianten mit veränderter Protein-Menge in *rrm4Δ*-Filamenten. (A) Das Cy2-Bild der DIGE-Analyse repräsentiert den internen Standard der Membran-assoziierten Proteinfraction hergestellt aus (siehe Abb. 2). Die mit Pfeilen versehenen Protein-Varianten zeigen einen mehr als 2,5-fachen Unterschied in der Proteinmenge auf. Die zwei Protein-Varianten von Cts1 und das ribosomale Protein Rps19 wurden im Vorfeld dieser Arbeit identifiziert (siehe Diplomarbeit J. Koepke, 2005). Die rot dargestellten Protein-Varianten 2, 3, 8 und 10 wurden in dieser Arbeit identifiziert (Größenmarker auf der linken Seite, pH-Gradient oben). (B) Darstellung von vergrößerten Gelausschnitten eines Cy5- und Cy3-Bildes der DIGE-Analyse. Diese Gelausschnitte zeigen die in dieser Arbeit identifizierten Protein-Varianten: Endochitinase Cts1 (Nr. 2) und die drei putativen Mitochondrienproteine Afg3-Protease (Nr. 3), Atp4 aus Komplex I (Nr. 8) und Nuo2 aus Komplex I (Nr. 10).

Tabelle 1: Auflistung der identifizierten Protein-Varianten aus der 2D-DIGE-Analyse.

Nr.	Gen	rel. Expressions- unterschied	Student T-test	MW (kDa)	pI	vorhergesagte Genfunktion
1	<i>rps19</i>	14,7	0,0005	17,8	5.07	probable RPS19B ribosomal protein S19
2	<i>cts1</i>	5,3	0,0019	54,9	8.20	endochitinase
3	<i>afg3</i>	4,5	0,0047	93,8	7.71	probable AFG3- protease of the SEC18/ CD48/PAS1 family of ATPases (AAA)
4	<i>cts1</i>	4,1	0,0028	54,9	8.20	endochitinase
5	n. i.	3,3	0,0047			
6	<i>cts1</i>	3,2	0,01	54,9	8.20	endochitinase
7	n. i.	3,0	0,013			
8	<i>atp4</i>	-3,1	0,0052	26	9.82	probable H ⁺ - transporting two-sector ATPase chain b precursor, mitochondrial
9	n. i.	-3,6	0,0061			
10	<i>nuo2</i>	-5,8	0,0007	18,7	6.77	related to nadh-ubiquinone oxidoreductase 21.3 kDa subunit

Die drei orange hinterlegten Protein-Varianten wurden im Vorfeld dieser Arbeit identifiziert (siehe Diplomarbeit J. Koepke, 2005) und in dieser Arbeit bestätigt (vorhergesagte Genfunktionen: MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>; detaillierte Angaben zur massenpektrometrischen Identifizierung siehe Anhang)

2.2 Sequenzanalyse der Endochitinase Cts1

In dieser Arbeit konnte eine dritte Protein-Variante (Nr.2) der Endochitinase Cts1 identifiziert werden. Die zuvor detektierten Protein-Varianten (Nr.4 und 6; Diplomarbeit J. Koepke, 2005) ließen sich in einer massenspektrometrischen Analyse bestätigen (siehe Anhang). Die Endochitinase Cts1 ist 502 Aminosäuren lang, hat ein Molekulargewicht von 54885,7 Da und einen pI bei 8,2 (um10419; MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>). Alle drei identifizierten Protein-Varianten wiesen eine deutliche Erhöhung der relativen Proteinmenge in der Membran-assoziierten Proteinfraction von *rrm4Δ*-Filamenten auf (siehe Tabelle 1). Die Positionen der Protein-Varianten im 2D-Gel stimmten mit den berechneten Protein-Daten überein, sie unterschieden sich untereinander nur durch geringe Abweichungen in ihrem isoelektrischen Punkt (Abb. 3A und B). Aus den ermittelten Peptid-Daten der massenspektrometrischen Analyse wurde die Protein-Variante Nr.2 anhand von elf Peptiden mit einer Sequenzabdeckung von 33,1% identifiziert, d.h. hier konnte eine Identifizierung von Peptiden des N-, des C-Terminus und mehreren Peptiden aus der Mitte der Aminosäuresequenz des vorhergesagten Proteins detektiert werden. Bei den Protein-Varianten Nr.4 und 6 konnten nur 26,2% bzw. 19,3% der vollständigen Aminosäure-Sequenz identifiziert werden, wobei bei beiden Protein-Varianten keine Peptide des N-

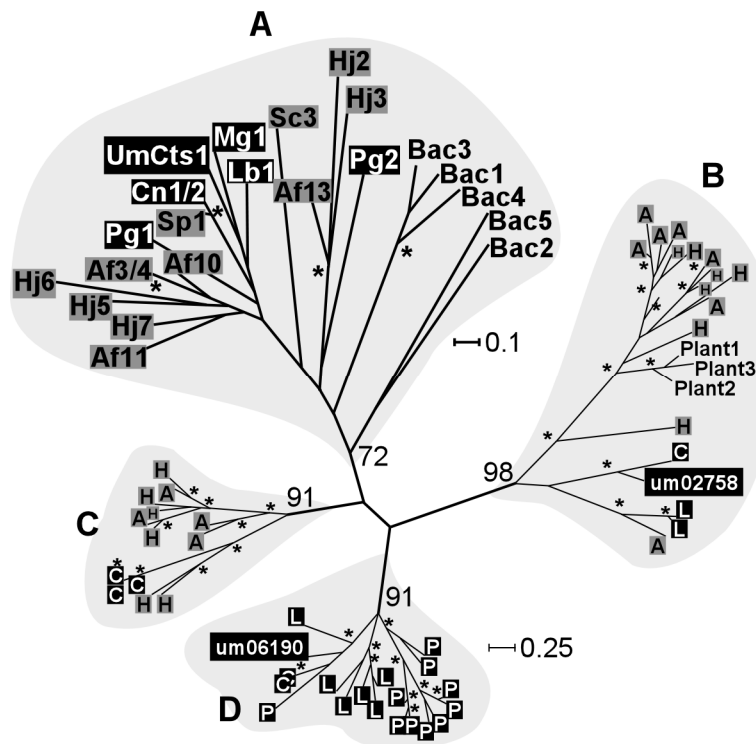


Abbildung 4: Die Endochitinase Cts1 wird dem Zweig A, den bakteriellen Endochitinasen, zugeordnet. Darstellung eines unverwurzelten phylogenetischen Baumes berechnet aus 80 stellvertretenden Enzymen der Glykosid-Hydrolase-Familie 18. Repräsentativ gezeigt sind Endochitinasen aus Bakterien (*Serratia marcescens*, *Vibrio fischeri* und *Vibrio harveyi*), höheren Pflanzen (*Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana*) und Pilzen (Ascomyceten und Basidiomyceten; Hintergrund hellgrau und schwarz). Die berechneten Maximum Likelihood Bootstrap Werte (1000 Perturbationen) sind an den Hauptverzweigungen angegeben (mit Sternchen sind Werte von über 90% markiert). Die Länge der Zweige korrespondieren mit der genetischen Verwandtschaft. Die Organismen haben folgende Abkürzungen: Sm, *S. marcescens*; Vf, *V. fischeri*; Vh, *V. harveyi*; Nt, *N. tabacum*; At, *A. thaliana*; Mg, *Malassezia globosa*; Sc, *S. cerevisiae*; Sp, *Schizosaccharomyces pombe*; Cn, *Cryptococcus neoformans*; Af, *A. fumigatus*; Hj, *H. jecorina*; Lb, *Laccaria bicolor*; Pg, *Puccinia graminis*. Die Zugangsnummern der Datenbank sind in Material und Methoden angegeben. Die drei putativen Endochitinasen aus *U. maydis* sind als UmCts1 (um10419), um06190 und um02758 dargestellt.

Um mögliche Genredundanzen zu untersuchen, wurde in Kooperation mit Dr. Dominik Begerow und Ronny Kellner (Ruhr Universität Bochum, Abteilung für Geobotanik) im Rahmen dieser Arbeit eine phylogenetische Analyse anhand einer repräsentativen Auswahl von 80 Chitinase-Sequenzen der Glykosyl-Hydrolase-Familie 18 aus Pilzen, Pflanzen und Bakterien vorgenommen (siehe Material und Methoden). Aus dieser Analyse ging hervor, dass der Stammbaum der Glykosyl-Hydrolase-Familie 18 sich in vier monophyletische Zweige aufteilen lässt (Abb. 4). Der Zweig A repräsentiert die Klasse III bzw. die bakteriellen Chitinasen, Zweig B die Klasse V bzw. die pflanzlichen Chitinasen, und Zweig C beinhaltet eine Gruppe von Chitinasen mit ungewöhnlich hohem Molekulargewicht, welche erst kürzlich anhand einer Analyse von Chitinasen aus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*) klassifiziert wurde (Seidl *et al.*, 2005). Der Zweig D wird aus Basidiomyzeten-spezifischen Glykosyl-Hydrolasen der Familie 18 gebildet (Abb. 4). Das *U. maydis*-Genom beinhaltet demnach drei Endochitinasen aus der Glykosyl-Hydrolase-Familie 18 unterschiedlichen Ursprungs. Die bakterielle Chitinase Cts1 wurde dem Zweig A zugeordnet, während sich die beiden anderen vorhergesagten Chitinasen, um02758 und um06190 (MUMDB), in die Zweige B und D gruppierten. Somit scheint *U. maydis* keine paralogen Endochitinasen zu Cts1 zu besitzen, die redundante Funktionen ausüben könnten.

2.3 Die Deletion von *cts1* hat keinen Einfluss auf das filamentöse Wachstum und auf die Pathogenität

Um die Rolle der Endochitinase Cts1 während der Ausbildung des Filamentes zu untersuchen, wurde eine Deletionsstudie im Stamm AB33 durchgeführt. Zusätzlich wurde *cts1* im solopathogenen Stamm SG200 deletiert (Bölker *et al.*, 1995), um den Einfluss der bakteriellen Endochitinase auf die Pathogenität zu analysieren. Das Deletionskonstrukt beinhaltete die Hygromyzin-Resistenz, welche in einem *SfiI*-Kassetten-System zwischen die stromaufwärts und stromabwärts liegenden Flanken von *cts1* ligiert wurde (Kämper, 2004; siehe Material und Methoden). Durch homologe Rekombination wurde somit der offene Leserahmen von *cts1* vollständig deletiert.

Die Deletion von *cts1* hatte keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten und die Morphologie von knospenden Sporidien, d.h. die Endochitinase ist nicht essentiell für die Hefe-artige Wachstumsphase von *U. maydis* (Daten nicht gezeigt). Nach Induktion des filamentösen Wachstums in Flüssigmedium unterschieden sich die *cts1*Δ-Filamente deutlich von Wildtyp-Filamenten durch verstärkte Aggregatbildung. Die Filamente

flokkulierten auf der Oberfläche des Flüssigmediums und neigten dazu an der Glaswand zu kleben (Abb. 5A). Die Deletionsfilamente bildeten zudem große Aggregate aus, indem sie mit ihren leeren Abschnitten aneinander hingen (Daten nicht gezeigt). Die Filamentmorphologie, gekennzeichnet durch die leeren Abschnitte und die Länge des Filaments, war jedoch mit dem Wildtyp-Filament vergleichbar, was sich durch wildtypisches Wachstum auf Aktivkohle-haltigem Festmedium darstellen ließ (Abb. 5B). Um die Zellwand-Integrität zu überprüfen, wurden verschiedene Stresskonditionen wie Zellwand-, Salz und osmotischer Stress getestet (CM 1% Glc- und NM 1% Glc-Platten mit 50 µM Calcoflour, 2 M Congo Rot, 2% Wasserstoffperoxid, 1 M NaCl und 1 M Sorbitol; Daten nicht gezeigt). Es konnten jedoch weder für die Teilung von Sporidien noch für das Wachstum von Filamenten des *cts1*Δ-Stammes eindeutige Unterschiede zum Wildtyp detektiert werden, d.h. im vegetativen Stadium von *U. maydis* konnte kein eindeutiger Zellwand-Defekt in der Abwesenheit der Endochitinase Cts1 beobachtet werden.

Die Deletion von *cts1* im solopathogenen Stamm SG200 ermöglichte Pflanzeninfektionsstudien ohne vorherige Paarung von kompatiblen Stämmen (Bölker *et al.*, 1995). Die Infektion von sieben Tage alten Maiskeimlingen deckten keinen Unterschied in der Pathogenität zwischen SG200 und SG200*cts1*Δ auf, da das Verhältnis der induzierten Pflanzensymptome und die Tumorraten keine Differenz zeigten (Abb. 5C). Zusammenfassend ergab der Verlust von Cts1 eine Veränderung der Hydrophobizität der Filamenten-Zellwand, welche jedoch zu keinen Veränderungen während der Penetration, der Proliferation in der Pflanze und der Tumorinduktion führte.

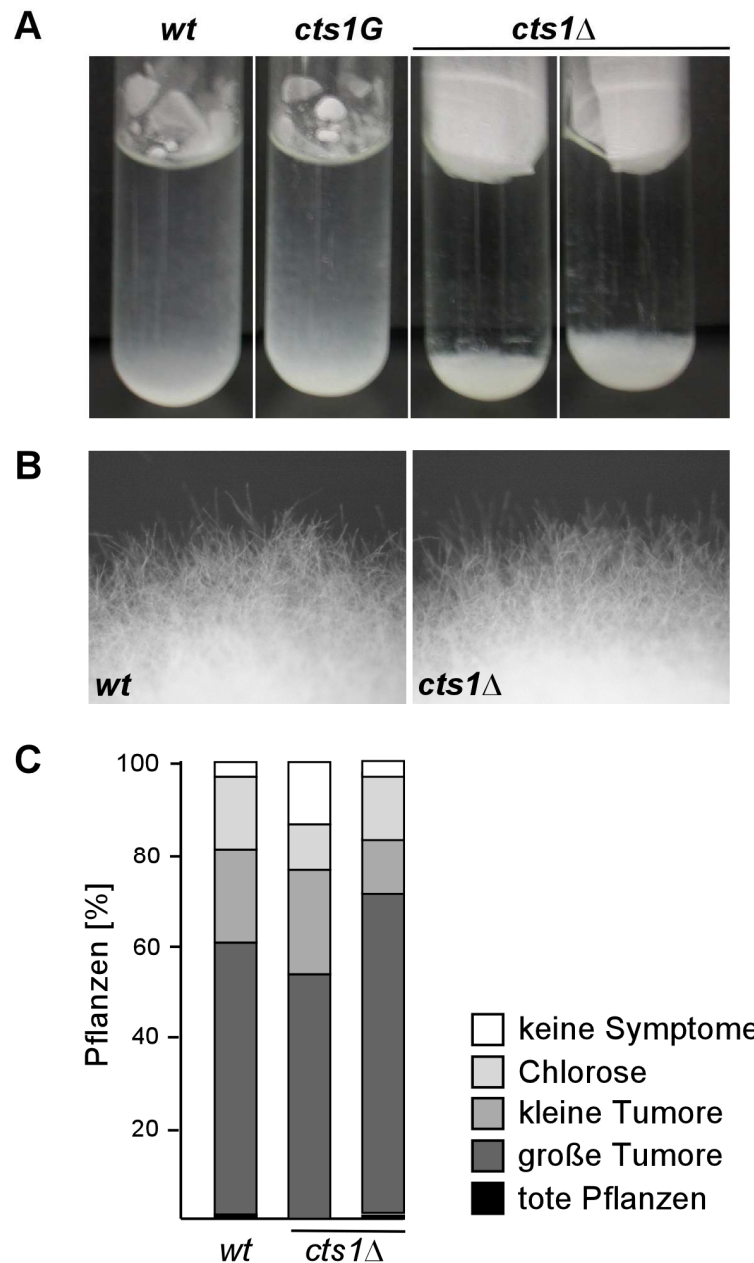


Abbildung 5: *cts1Δ*-Filamente zeigen einen Aggregationsphänotyp in Flüssigmedium. (A) Darstellung des Wachstumsverhaltens von 16 h induzierten Filamenten in Flüssigkultur (Reagenzglas). Analyse folgender Stämme: AB33 (*wt*), AB33*cts1G* (*cts1G*) und AB33*cts1Δ* (*cts1Δ*). (B) Aufnahme vom Rand einer Kolonie der Stämme AB33 (*wt*) und AB33*cts1Δ* (*cts1Δ*) getropft auf Aktivkohle-haltigem Festmedium. Nach 24-stündiger Induktion der Filamente bildet der *cts1Δ*-Stamm wildtypische Filamente aus. (C) Ergebnisse eines Pflanzeninfektionsexperiments mit den solopathogenen Stämmen SG200 und SG200*cts1Δ* (zwei unabhängige Stämme). Der Anteil an Pflanzen mit den typischen Symptomen ist angegeben. Pro Stamm wurden mindestens 110 Pflanzen infiziert.

2.4 Die *ctsI*-mRNA akkumuliert in Rrm4-abhängigen Partikeln

Eine Analyse der subzellulären Lokalisation der *ctsI*-mRNA mit der FISH-Methode (*fluorescent in situ hybridization*) sollte Aufschluss darüber geben, ob diese eine direkte Ziel-mRNA von Rrm4 ist (König *et al.*, 2009). Hierzu wurde der Stamm AB33cts1G generiert, welcher Cts1 mit C-terminaler Fusion von eGfp (*enhanced version of the green fluorescence protein*; Clontech) unter dem endogenen Promotor exprimiert. Dieser Stamm wurde mittels eines *SfiI*-abhängigen Kassetten-Systems über homologe Rekombination hergestellt (Brachmann *et al.*, 2004); siehe Material und Methoden). Die induzierten Filamente dieses Stammes zeigten in Flüssigkultur keinen *ctsI* Δ -Phänotyp, was für die Funktionalität des Fusionsproteins sprach (Abb. 5A). Als heterologe Kontrolle wurde der Stamm AB33P_{tef}gfp in die FISH-Analyse einbezogen, der die heterologe *gfp*-mRNA unter dem konstitutiv aktiven Promotor P_{tef} exprimiert (Spellig *et al.*, 1996). Um die Lokalisation der mRNAs in Abhängigkeit von Rrm4 zu beurteilen, wurden zudem die beiden Stämmen AB33cts1G/*rrm4* Δ und AB33P_{tef}gfp/*rrm4* Δ hergestellt.

Um die Expression beider mRNAs zu überprüfen, wurde ein Northern-Experiment durchgeführt. Es konnten keine Expressionsunterschiede zwischen der *gfp*-Kontroll-mRNA und der *ctsI*G-mRNA detektiert werden. Des Weiteren hatte die Deletion von *rrm4* in den kompatiblen Stämmen keinen Einfluss auf die Menge der mRNAs (Abb. 6A). Für die Analyse wurden acht Stunden induzierte Filamente eingesetzt, welche zum optimalen Vergleich mit dem gleichen Set an DNA-Oligonukleotiden gegen *gfp* behandelt wurden (König *et al.*, 2009). Die mikroskopische Analyse der hybridisierten AB33cts1G-Filamente zeigte punktförmige Fluoreszenz-Signale der *ctsI*G-mRNA in gleichmäßig verteilten, zytoplasmatischen Partikeln (Abb. 6B). Als Negativ-Kontrolle wurden AB33-Filamente analysiert, in denen keine Signale zu erkennen waren, was die Spezifität der DNA-Oligonukleotide unterstrich. Im Vergleich zum Ausgangsstamm war die Partikelanzahl in AB33cts1G/*rrm4* Δ drastisch reduziert. Dies führte zu dem Schluss, dass die Lokalisation der *ctsI*G-mRNA in zytoplasmatischen Partikeln eindeutig von Rrm4 abhängig ist. Zur statistischen Absicherung und Quantifizierung wurden die punktförmigen Fluoreszenzsignale anhand einer zweidimensionalen Linien-Analyse mit dem speziell entwickelten Programm PIA detektiert (*peak-identifying algorithm*, Abb. 5B, siehe Material und Methoden; K. Zarnack, J. König und M. Feldbrügge, unveröffentlicht; König *et al.*, 2009). Für den Stamm AB33cts1G wurden insgesamt 65 Filamente analysiert, welche im Durchschnitt 11 *ctsI*G-mRNA Partikeln aufwiesen (Abb. 6C). Diese Partikel waren Rrm4-abhängig, da die Deletion von *rrm4* zu einer drastischen Reduktion der Partikel-Anzahl

führte. Weiterhin akkumulierte auch die heterologe Kontroll-mRNA *gfp* in Partikeln, jedoch wies der Stamm AB33P_{tef}*gfp* wesentlich weniger Rrm4-abhängige Partikel auf (Abb. 6B und C). Obwohl die mRNAs gleich exprimiert wurden, konnte die *cts1G*-mRNA somit signifikant häufiger in Rrm4-abhängigen Partikeln detektiert werden. Dieses Ergebnis stimmt mit vorherigen Beobachtungen überein, dass prinzipiell jede mRNA in Rrm4-abhängigen Partikeln nachweisbar ist. Direkte Ziel-mRNAs werden jedoch mit erhöhter Häufigkeit von Rrm4 gebunden (König *et al.*, 2009). Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei der *cts1*-mRNA um eine direkte Ziel-mRNA des Rrm4-abhängigen RNA-Transports handelt.

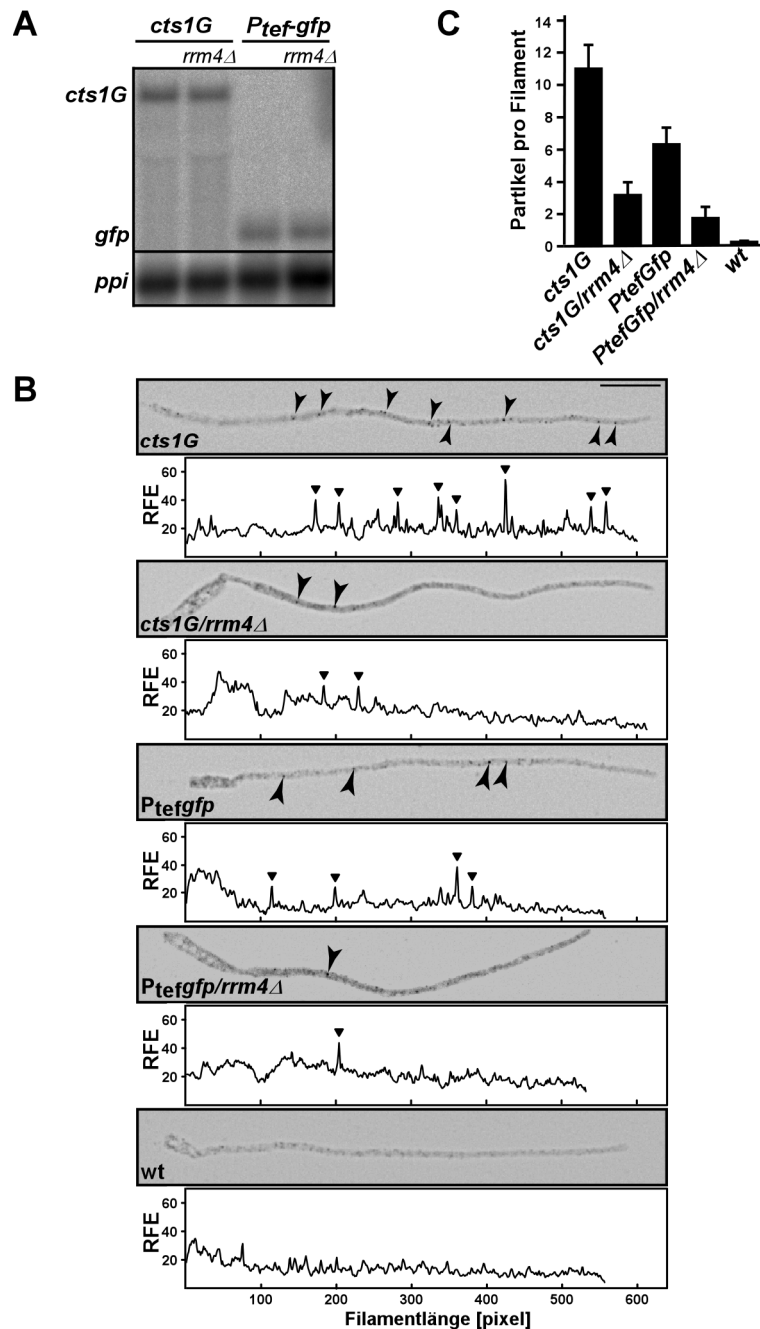


Abbildung 6: *cts1G*-mRNA akkumuliert in Rrm4-abhängigen mRNPs. (**A**) Darstellung einer Northern-Analyse zum Vergleich der Expression von *cts1G*- und *gfp*-mRNA (links angezeigt). Die *ppi*-mRNA kodiert für eine Peptidyl-Prolyl-Isomerase und dient als Ladekontrolle. (**B**) FISH-Analyse. Darstellung von invertierten Fluoreszenzaufnahmen fixierter Filamente der Stämme AB33 (*wt*), AB33*cts1G* (*cts1G*), AB33*cts1G/rrm4Δ* (□□□ *cts1G/rrm4Δ*), □AB33*P_{tef}gfp* (*P_{tef}gfp*) und AB33*P_{tef}gfp/rrm4Δ* (□□□□ *P_{tef}gfp/rrm4Δ*). Zusätzliche graphische Darstellung der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) aufgetragen entlang der Längsachse des Filaments. Die Detektion der gezählten Partikel (schwarze Pfeile) wurde mit dem Programm PIA erstellt (König *et al.*, 2009; Zarnack K., König J. und Feldbrügge M. unveröffentlicht; siehe Material und Methoden). (**C**) Graphische Darstellung der im Durchschnitt pro Filament mit dem Programm PIA detektierten Partikeln. Pro Stamm wurden mindestens 65 Filamente aus drei unabhängigen Experimenten analysiert. Die Genotypen der Stämme sind unten angegeben.

2.5 Cts1 ist in *rrm4*Δ-Filamenten in der Membran-assoziierten Proteinfraction stark angereichert

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Cts1 wurden AB33cts1G und AB33cts1G/*rrm4*Δ in Western-Experimenten getestet. Es wurden Proteinproben von knospenden Sporidien und acht Stunden induzierten Filamenten generiert und analysiert. Beim Vergleich der Gesamtzellextrakte von Sporidien und Filamenten ließ sich erkennen, dass die Menge an Cts1G während des filamentösen Wachstums deutlich anstieg (Abb. 7A, links, Spur 1 und 3). Zusätzlich ließ sich im Gesamtzellextrakt von Filamenten eine Erhöhung von Cts1G im *rrm4*Δ-Stamm detektieren (Abb. 7A, links, Spur 3 und 4). In den löslichen, d.h. zytoplasmatischen Proteinfractionen konnte kein Unterschied in Abhängigkeit von Rrm4 beobachtet werden (Abb. 7A, rechts). Die Analyse der Membran-assoziierten Proteinfraction von Sporidien zeigte ebenfalls keinen Unterschied zwischen AB33cts1G und AB33cts1G/*rrm4*Δ (Abb. 7B, Spur 1 und 2). Im Vergleich der Membran-assoziierten Proteinfraction aus Filamenten konnte jedoch die stärkste Rrm4-abhängige Mengendifferenz von Cts1G detektiert werden, d.h. die Deletion von Rrm4 führt zu einer Anreicherung von Cts1G in der Membranfraction der Filamente (Abb. 7B, Spur 3 und 4). Zusätzlich ließ sich in beiden Fraktionen aus Filamenten eine posttranslationale Modifizierung erkennen (Abb. 7A und B, Spur 3 und 4), welche jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde.

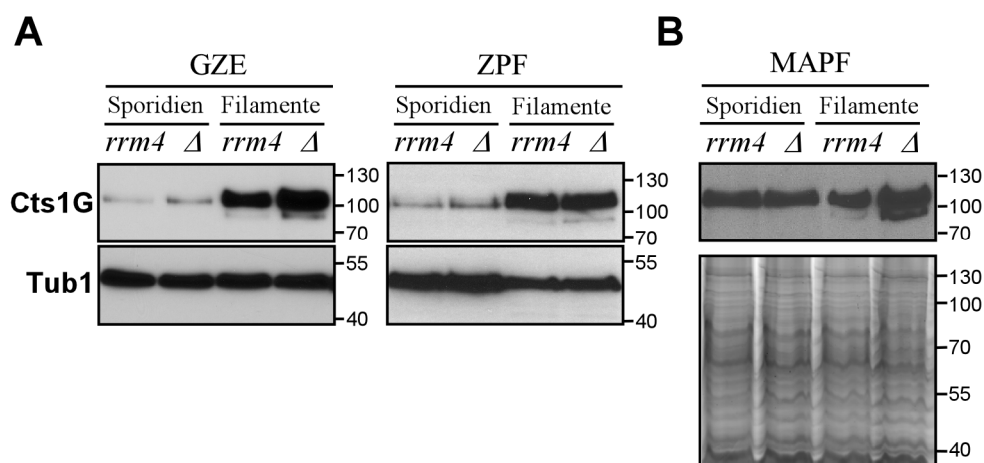


Abbildung 7: Die erhöhte Menge an Cts1G in der Membran-assoziierten Proteinfraction von *rrm4*Δ-Filamenten. Fraktionierte und vergleichende Western-Analyse von haploiden Sporidien und Filamenten der Stämme AB33cts1G und AB33cts1G/*rrm4*Δ. Darstellung der Fraktionen (**A**) Gesamtzellextrakt (GZE) und zytoplasmatische Proteinfraction (ZPF), und (**B**) Membran-assoziierte Proteinfraction (MAPF). Bezeichnung der detektierten Proteine links; Proteingrößenmarker rechts (kD). Die Detektion von α-Tubulin (Tub1) und die Proteinfärbung mit Deep Purple (GE Healthcare) dienen als Ladekontrolle.

Diese Ergebnisse bestätigten somit die aus der DIGE-Analyse ermittelten Daten. Es konnte gezeigt werden, dass es während des filamentösen Wachstums zu einer gesteigerten Expression der Endochitinase kommt und dass der Verlust von Rrm4 zu einer Erhöhung von Cts1 in der Membran-assoziierten Proteinfraction führt.

2.6 Cts1G lokalisiert in der subapikalen Wachstumszone der Filamente

Zur Überprüfung einer Rrm4-abhängigen Lokalisation der Endochitinase Cts1 wurden die Stämme AB33cts1G und AB33cts1G/rrm4 Δ mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. In knospenden Sporidien beider Stämme konnte ein gleichmäßig verteiltes, zytoplasmatisches Fluoreszenzsignal beobachtet werden. Zusätzlich wurde in der Membran eine einheitliche, aber schwache Lokalisation detektiert, wobei keine Akkumulation am Septum zwischen Mutter- und Tochterzelle zu erkennen war (Abb. 8A). Diese Beobachtung stimmte mit dem Ergebnis überein, dass die *cts1* Δ -Stämme keinen Teilungs- bzw. Wachstumsdefekt aufwiesen. Passend zu der Western-Analyse konnten auch im visuellen Vergleich dieser Sporidien keine von Rrm4 abhängigen Intensitäts-Unterschiede identifiziert werden.

In acht Stunden induzierten Filamenten lokalisierte Cts1G überwiegend subapikal in der Membran der Wachstumszone (Abb. 8B, oben). Es konnte auch in Filamenten keine Akkumulation am Septum beobachtet werden. In bipolar auswachsenden Filamenten von AB33cts1G/rrm4 Δ ließ sich eine Membranlokalisation in beiden Wachstumszonen detektieren. Interessanterweise akkumulierte Cts1G auch in unipolaren Filamenten dieses Stammes bipolar, d.h. subapikal in der Wachstumszone und in der Membran der Mutterzelle (Abb. 8B, unten). Diese Resultate stimmten mit der erhöhten Menge von Cts1G in der Membran-assoziierten Proteinfraction aus *rrm4* Δ -Filamenten überein. Demnach akkumuliert Cts1G im Wildtyp unipolar an der wachsenden Hyphenspitze. In der Abwesenheit von Rrm4 kommt es zu einer bipolaren Lokalisation und damit zu einer Erhöhung der Menge an Cts1G in der Membranfraction.

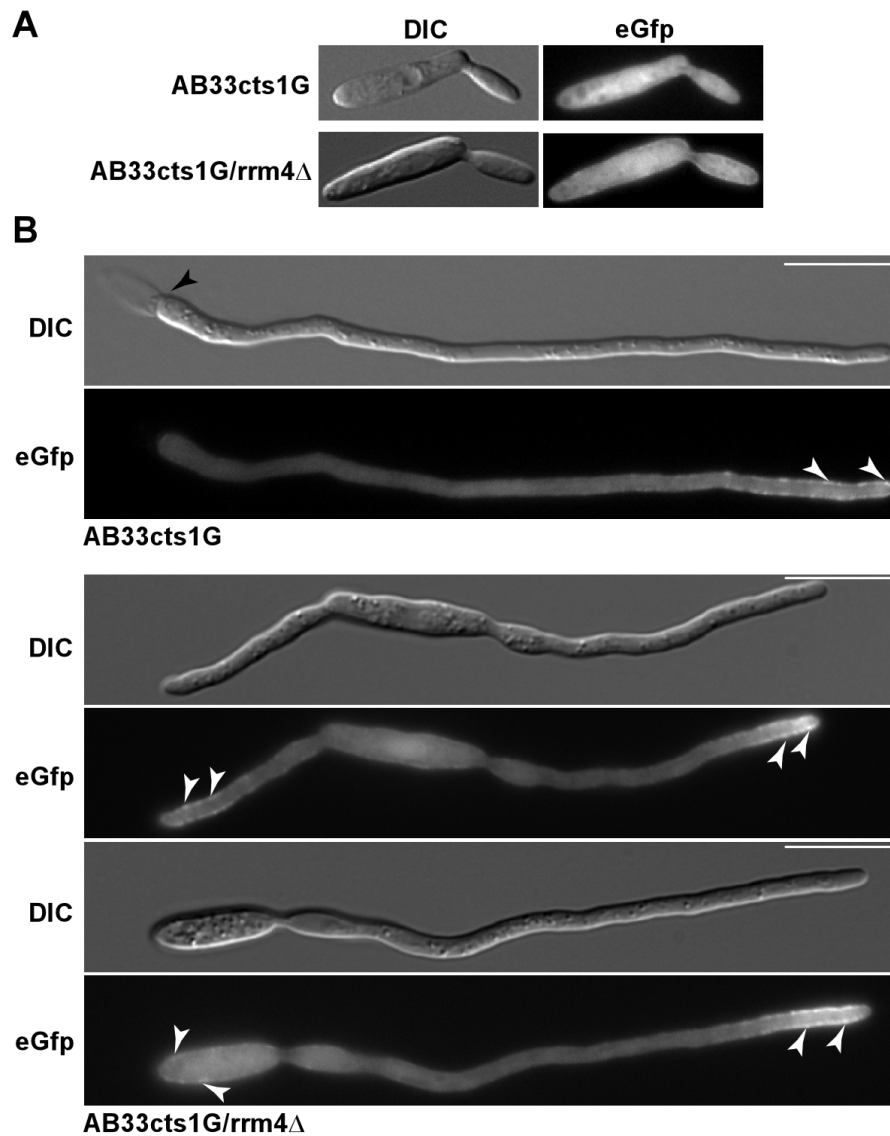


Abbildung 8: Die subapikale Lokalisation von Cts1G in Filamenten. Darstellung von DIC- und Fluoreszenzaufnahmen von (**A**) knospendenden, haploiden Sporidien und (**B**) acht Stunden induzierten Filamenten der Stämme AB33cts1G und AB33cts1G/rrm4Δ. Die unteren Abbildungen zeigen ein unipolar und ein bipolar auswachsendes *rrm4Δ*-Filament. Schwarze Pfeile weisen auf die leeren Abschnitte mit eingezogenem Septum hin. Weiße Pfeile markieren die subapikale Cts1G-Lokalisation an der wachsenden Hyphenspitze und im bipolaren *rrm4Δ*-Filament in der Membran der initialen Mutterzelle. Größenmaßstab = 10 µm.

2.7 Die Sekretion von Cts1 ist vom Mikrotubuli-abhängigen Rrm4-Transport abhängig

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Cts1-Menge in *rrm4* Δ -Filamenten zu einer gesteigerten Enzymaktivität führt, wurde die endochitinolytische Aktivität anhand des spezifischen fluoreszierenden Substrates 4-Methylumbelliferyl β -D-N,N',N''-Triacetylchitotrioside (SIGMA Aldrich) gemessen. Der Stamm AB33cts1 Δ wurde in diesem Experiment als Kontrolle verwendet, um den Einfluss der beiden anderen Endochitinasen in *U. maydis* zu untersuchen.

In Vorexperimenten, in denen die Enzymaktivität zum einen der Überstände und zum anderen der Pellets von Sporidien- und Filament-Flüssigkulturen verglichen wurden, konnte die höchste Enzymaktivität in Pellets der Sporidien und Filamente detektiert werden. Dieses Resultat bestätigte die Annahme, dass extrazelluläre Endochitinasen nicht in das Medium freigesetzt werden, sondern mit der Zelloberfläche, möglicherweise mit der Zellwand, assoziiert sind. Weiterhin wurde in Übereinstimmung mit den bisher ermittelten Daten keine Veränderung der Endochitinaseaktivität zwischen Sporidien der Stämme AB33 und AB33rrm4 Δ , sowie der Stämme AB33cts1G und AB33cts1G/rrm4 Δ ermittelt (Abb. 9A, hell-graue Balken). Interessanterweise konnte in dem *cts1* Δ -Stamm eine drastische Abnahme der Enzymaktivität beobachtet werden. Demnach scheint die Endochitinase Cts1 in diesem Stadium von *U. maydis* die Hauptaktivität auszumachen (Abb. 9A).

Die endochitinolytische Enzymaktivität von Filamenten zeigte eine deutliche Steigerung im Vergleich zu den knospenden Sporidien (Abb. 9A, schwarze Balken). Die Enzymaktivität in acht Stunden induzierten Filamenten der wildtypischen Stämme AB33 und AB33cts1G war mehr als doppelt so hoch wie in Sporidien. Dies stimmte mit den Daten der Western-Analyse überein (Abb. 7A). Entgegen der Ausgangshypothese wiesen die Filamente des *rrm4* Δ -Stammes eine drastische Abnahme der Enzymaktivität auf (Abb. 9A), obwohl in diesen Filamenten zuvor eine Erhöhung der Cts1-Menge detektiert wurde (Abb. 7A). Der Verlust von Rrm4 könnte entweder zu einer erhöhten Produktion einer inaktiven Cts1-Variante führen oder die Sekretion des Proteins stören. Zur Aufklärung dieser beiden Möglichkeiten wurde die Membran-permeabilisierende Substanz Digitonin verwendet, da durch eine Permeabilisierung aktive, jedoch nicht sekretierte Cts1-Enzymaktivität gemessen werden kann. In diesem Experiment wurde die endochitinolytischen Enzymaktivität von AB33- und AB33rrm4 Δ -Filamenten bei verschiedenen Digitonin-Konzentrationen gemessen. Die Zugabe von Digitonin führte in beiden Stämmen zu einer starken Erhöhung der Enzymaktivität, d.h. der größte Anteil der

Cts1 in Filamenten wurde nicht sekretiert (Abb. 9B). Ab einer Digitonin-Konzentration von 20 μM kam es in *rrm4* Δ -Filamenten zu einer drastischen Steigerung der Enzymaktivität, welche eindeutig über der Enzymaktivität der Wildtyp-Filamente lag (Abb. 9B). Das Maximum der endochitinolytischen Enzymaktivität wurde bei einer Digitonin-Konzentration von 162 μM detektiert, wobei diese in *rrm4* Δ -Filamenten im Vergleich zu Wildtyp-Filamenten fast verdoppelt vorlag. Folglich ist die Sekretion durch den Verlust von Rrm4 deutlich beeinträchtigt, und es kommt in *rrm4* Δ -Filamenten zu einer intrazellulären Akkumulation der aktiven Endochitinase Cts1.

Um zu überprüfen, ob die gestörte Sekretion von Cts1 mit der Funktion von Rrm4 während des Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transports in Verbindung steht, wurde die endochitinolytische Aktivität nach Störung des Mikrotubuli-Zytoskeletts ermittelt. Hierfür wurden einerseits Aktivitäts-Messungen von Filamenten durchgeführt, welche zuvor mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl behandelt wurden, und andererseits wurden Filamente des Stammes AB33kin1 Δ , welcher eine Deletion des konventionellen Kinesin-Gens *kin1* trägt, auf ihre endochitinolytische Enzymaktivität untersucht. Der Verlust des molekularen Motors Kin1 führt in Filamenten zur Akkumulation von Rrm4-Partikeln an der Hyphenspitze (Becht *et al.*, 2006). Nach vierstündiger Behandlung mit 20 μM Benomyl konnte eine drastische Abnahme der endochitinolytischen Enzymaktivität von acht Stunden induzierten Wildtyp-Filamenten detektiert werden (Abb. 9C, schwarze Balken). Übereinstimmend wurde in den *kin1* Δ -Filamenten ebenfalls nur eine sehr geringe Enzymaktivität gemessen werden (Abb. 9C, hell-graue Balken). Zur Bestätigung, dass die drastische Abnahme der Enzymaktivität auf eine Beeinträchtigung der Sekretion von Cts1 zurückzuführen ist, wurden diese Filamente mit 162 μM Digitonin behandelt und erneut deren endochitinolytische Enzymaktivität ermittelt. Aufgrund der Membran-Permeabilisation konnte eine enorme Steigerung der Enzymaktivität in beiden Fällen gemessen werden (Abb. 9D), was darauf hindeutete, dass die Sekretion in diesen Filamenten ebenfalls gestört war.

Demnach sind für eine effiziente Sekretion der Endochitinase Cts1 das Mikrotubuli-Zytoskelett, das konventionelle Kinesin Kin1 und Rrm4 von entscheidender Bedeutung. Dieses Resultat ist in Übereinstimmung mit der Hypothese, dass Mikrotubuli-abhängiger mRNA-Transport, vermittelt durch Rrm4, die Sekretion der Endochitinase Cts1 reguliert.

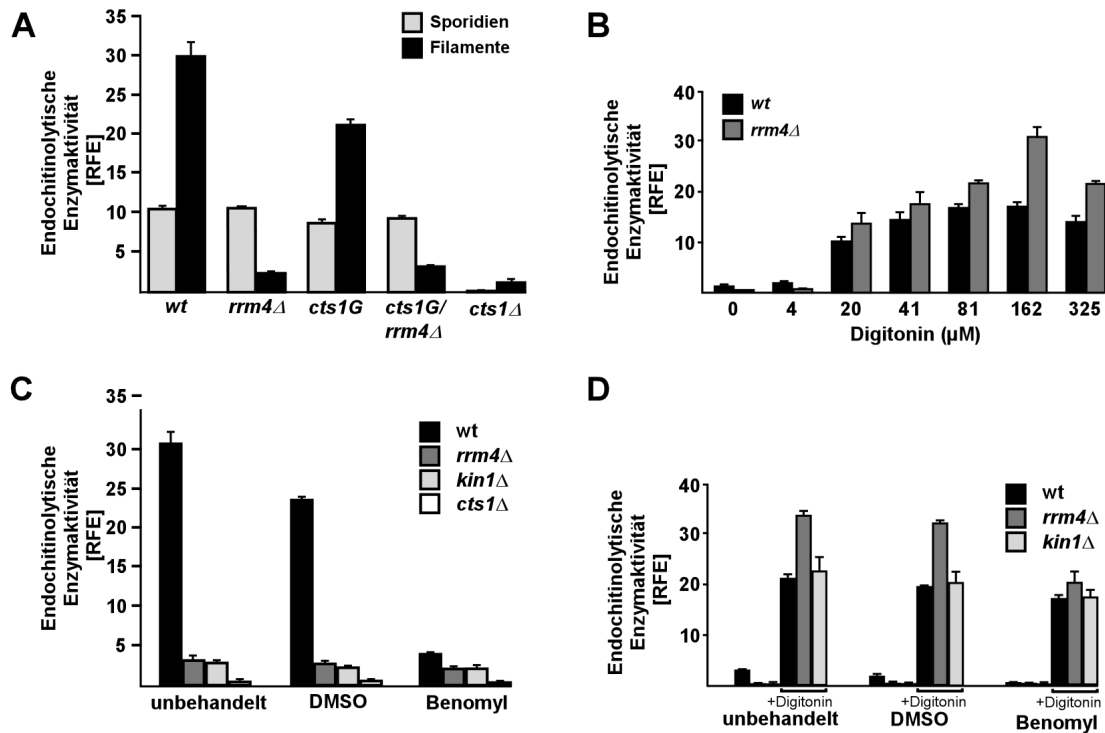


Abbildung 9: Die Sekretion von Cts1 ist vom Mikrotubuli-abhängigen Rrm4-Transport abhängig. (A) Graphische Darstellung der relativen endochitinolytischen Enzymaktivität, gemessen in relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE), von knospenden Sporidien (hellgraue Balken) im Vergleich zu acht Stunden induzierten Filamenten (schwarze Balken). Folgende Stämme wurden analysiert: AB33 (*wt*), AB33*rrm4Δ* (*rrm4Δ*), AB33*cts1G* (*cts1G*), AB33*cts1G/rrm4Δ* (*cts1G/rrm4Δ*) und AB33*cts1Δ* (*cts1Δ*) (Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung, n = 3). (B) Graphische Darstellung der relativen endochitinolytischen Aktivität von Wildtyp- (schwarze Balken) und *rrm4Δ*-Filamenten (graue Balken) unter Einfluss steigender Digitonin-Konzentrationen. (C) Graphische Darstellung der relativen endochitinolytischen Aktivität acht Stunden induzierter Filamente folgender Stämme: AB33 (*wt*, schwarze Balken), AB33*rrm4Δ* (*rrm4Δ*, graue Balken), AB33*kin1Δ* (*kin1Δ*, hellgraue Balken) und AB33*cts1Δ* (*cts1Δ*, weiße Balken). Zum Vergleich wurden unbehandelte, mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte und mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl (20 μM, 4 h) behandelte Filamente gemessen. (D) Graphische Darstellung der relativen endochitinolytischen Enzymaktivität desselben Experimentaufbaus wie in (C) mit zusätzlicher Digitonin-Behandlung (162 μM) zur Permeabilisierung der Membran. Alle Fluoreszenz-Messungen wurden jeweils mit den optimalen Verstärker-Einstellungen (*gain*) gemessen (siehe Material und Methoden), d.h. die RFE-Werte der einzelnen Balkendiagramme können nicht direkt miteinander verglichen werden.

2.8 Charakterisierung der mitochondrialen Proteine Afg3, Nuo2 und Atp4

Zwei der drei identifizierten putativen Mitochondrien-Protein, Atp4 und Nuo2, kodierten für vorhergesagte Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette und wiesen beide eine verminderte Proteinmenge in *rrm4Δ*-Filamenten auf, wohingegen das dritte identifizierte Mitochondrien-Protein Afg3 in Abwesenheit von Rrm4 eine erhöhte Proteinmenge aufzeigte. Die identifizierte Protease Afg3 (Nr.3: um00898; MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>), wurde mit einer 4,5-fachen Erhöhung der relativen Proteinmenge im Filament des *rrm4Δ*-Stammes charakterisiert. Das Protein Afg3 ist 860 Aminosäuren lang, besitzt ein Molekulargewicht von 93,8 kDa und einen berechneten pI von 7,7 (MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>).

Afg3 ist eine Untereinheit der m-AAA-Protease (*ATPase associated with diverse cellular activities*), deren Aufgabe die Qualitätskontrolle in der inneren Mitochondrienmembran ist. Dabei werden nicht korrekt assemblierte Membranprotein-Komplexe der Atmungskette durch Abbau reguliert (Tatsuta & Langer, 2008). Eine Proteinsequenzanalyse ergab drei für Afg3 charakteristische Domänen, FtsH, AAA und eine Peptidase_M41-Domäne (<http://smart.embl.de/>; *FtsH_extracellular*, Pfam: PF06480, AS 209-379, E-value: $2.40e^{-30}$; *AAA-domain*, IPR 003593, AS 402-542, E-value: $2.02e^{-21}$; *Peptidase_M41*, Pfam: PF01434, AS 604-805, E-value: $3.00e^{-100}$; (Schultz et al., 1998); (Letunic et al., 2004) (Letunic et al., 2009). Die Position der Afg3-Protein-Spezies im 2D-Gel stimmte nicht mit den berechneten Daten des vollständigen Proteins überein, jedoch wurden in der massenspektrometrischen Analyse nur drei Peptide aus der Proteinmitte identifiziert (siehe Anhang). Der N- und C-Terminus von Afg3 konnte nicht identifiziert werden. Für Afg3 konnte kein N-terminales Signalpeptid vorhergesagt werden konnte und ein solches würde nicht zu einem so großen Verlust des Molekulargewichts führen. Dementsprechend könnte es sich auch um ein Abbauprodukt, bedingt durch die Herstellung der Membran-assoziierten Proteinfraktion oder durch intrazellulären Proteinabbau, handeln.

Die identifizierte Komplex I-Untereinheit Nuo2 (Nr.8: um11495; MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) ist 181 Aminosäuren lang, hat ein Molekulargewicht von 18,7 kDa, einen pI von 6,8 und kodiert für eine membranständige Untereinheit der NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase. Nuo2 beinhaltet zwei vorhergesagte Transmembrandomänen und eine Tim17-Domäne (MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>; <http://smart.embl.de/>; Pfam: PF 02466, *Tim17 domain*; AS 13-133; E-value: $5.10e^{-08}$; Schultz et al., 1998; Letunic et al., 2004; Letunic et al., 2009). Die Position der identifizierten Protein-Spezies im 2D-Gel stimmte mit den

vorhergesagten Angaben des vollständigen Proteins überein, welches mit den detektierten Peptiden der massenspektrometrischen Analyse über die gesamte Aminosäuresequenz bestätigt werden konnte. Dementsprechend beinhaltet Nuo2 am N-Terminus kein abspaltbares Signalpeptid, sondern die Transmembrandomäne fungiert als eine interne Signalsequenz (Wiedemann *et al.*, 2004).

Atp4 (Nr.10: um10548; MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) ist 240 Aminosäuren lang, hat ein Molekulargewicht von 26 kDa, einen pI von 9,8 und entspricht der B-Untereinheit der mitochondrialen F_1F_0 -ATPase (Komplex V). Eine Proteinanalyse ergab, dass Atp4 am N-Terminus ein 16 Aminosäuren langes Signalpeptid trägt und eine für die B-Untereinheit eindeutige Domäne aufweist (<http://smart.embl.de/>; Pfam: *Mt Atp-synt B*; AS 70-232; E-value: $1.50e^{-56}$; Schultz *et al.*, 1998; Letunic *et al.*, 2004; Letunic *et al.*, 2009). Die F-ATPasen, auch bekannt als *H(+)-transporting two-sector ATPases*, sind Membran-gebundene Enzymkomplexe/ Ionentransporter, welche die ATP-Synthese mit dem Transport von Protonen über Membranen verknüpft. Dabei wird die Energie des Protonengradienten genutzt, um den Ionenfluss durch den ATPase-Protonenkanal in die Synthese von ATP umzusetzen (Cross & Muller, 2004; Rappas *et al.*, 2004). Die F-ATPase besteht aus zwei verknüpften, rotierenden Komplexen, wobei F_1 die katalytische Einheit und F_0 den Membran-eingebetteten Protonenkanal bildet. Der F_0 -Komplex besteht in Mitochondrien aus neun Untereinheiten (A-G, F6, F8), und die B-Untereinheit Atp4 ist ein Teil des peripheren Arms, welcher den F_0 - mit dem F_1 -Komplex verknüpft (Yasuda *et al.*, 2001; Carbajo *et al.*, 2005). Die Position von Atp4 im 2D-Gel zeigte Übereinstimmung mit dem berechneten Molekulargewicht, aber nicht mit dem vorhergesagten isoelektrischen Punkt. Die mittels Massenspektrometrie detektierten Peptide wiesen jedoch auf ein Fehlen des N-Terminus hin, möglicherweise durch die Abspaltung des Signalpeptides. Der Verlust des Signalpeptides führt zu einem Molekulargewicht von 24,3 kDa und einem pI von 7,5. Diese berechneten Protein-Daten sind in Übereinstimmung mit der Position im 2D-Gel.



Abbildung 10: Die Domänenstruktur der drei putativen Mitochondrienproteine Afg3, Nuo2 und Atp4. Schematische Darstellung der Domänenstruktur der Afg3-Protease mit der *FtsH_extracellular*-, AAA- und *Peptidase M41*-Domäne. Die Komplex I-Untereinheit Nuo2 mit der *Tim17*-Domäne. Die Komplex V-Untereinheit Atp4 mit einem N-terminalen Signalpeptid (S) und einer *Mt Atp4 synt B*-Domäne. Aminosäuren (AS)-Längenmaßstab.

Auffällig waren die entgegengesetzten Expressionsunterschiede dieser drei mitochondrialen Proteine in *rrm4Δ*-Filamenten, d.h. die beiden Untereinheiten der Atmungskette, Atp4 und Nuo2, waren verringert und die identifizierte m-AAA-Protease Afg3 war erhöht. Zusammenfassend resultierte der Verlust von Rrm4 in einer Veränderung der Expression von drei putativen Proteinen aus der inneren Mitochondrienmembran, welche einerseits eine Funktion in der Atmungskette und andererseits eine proteolytische Funktion besitzen.

2.9 Lokalisationsstudie der putativen Mitochondrien-Proteine Afg3, Nuo2 und Atp4

Für die Analyse der subzellulären Lokalisation der drei putativen Mitochondrien-Proteine Afg3, Nuo2 und Atp4 wurden C-terminale Fusionen mit Gfp hergestellt. Hierfür wurde eine spezielle Klonierungsstrategie gewählt, die den Verlust möglicher *cis*-aktiver Elemente in der mRNA ausschließt (Abb. 11). Die Strategie basierte auf der Klonierung der endogenen 3'UTR im Anschluss an die C-terminale Fusion mit eGfp, d.h. das entstandene Konstrukt beinhaltet die endogenen 3'UTR gefolgt von der Resistenzkassette (Abb. 11). C-terminal an die Resistenzkassette wurde die verdoppelte 3'UTR mit verlängerter rechter Flanke fusioniert. Bei der Herstellung der jeweiligen Stämme konnte damit die homologe Rekombination an drei Stellen stattfinden: innerhalb der linken Flanke mit 5'UTR und entsprechendem Gen, innerhalb der verdoppelten 3'UTR vor der Resistenzkassette sowie innerhalb der 3'UTR mit verlängerter rechter Flanke. Auf diese Weise könnten resistente Stämme mit und ohne eGfp-Fusion entstehen, wobei die Stämme mit eGfp-Fusion aufgrund der längeren Flanke häufiger auftreten sollten. Die Konstrukte wurden jeweils in AB33 und AB33rrm4Δ transformiert (AB33atp4, AB33atp4/rrm4Δ, AB33nuo2, AB33nuo2/rrm4Δ, AB33afg3 und AB33afg3/rrm4Δ). Zur eindeutigen Lokalisationsbestimmung der Fusionsproteine wurden die Stämme mit dem rotfluoreszierenden Mitochondrien-Farbstoff *MitoTracker[®] Red* (*MitoTracker[®] Red CM-H₂XRos*, Invitrogen) behandelt. Für die mikroskopische Analyse der Sporidien wurden die Stämme in CM-Medium kultiviert, eine Probe aus der exponentiellen Wachstumsphase entnommen und mit dem Lebendfarbstoff *MitoTracker[®] Red* behandelt. Zusätzlich wurden acht Stunden in NM-Medium induzierte Filamente mikroskopisch analysiert.

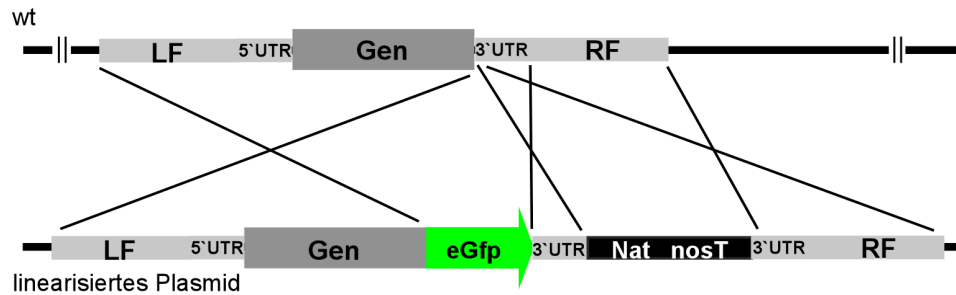


Abbildung 11: Die Klonierungsstrategie für die putativen Mitochondrien-Proteine Atp4, Nuo2 und Afg3. Schematische Darstellung der hergestellten Konstrukte für die drei identifizierten mitochondrialen Proteine. Die drei möglichen homologen Rekombinationsereignisse sind mittels überkreuzender Linien dargestellt. Die linke Flanke (LF), die rechte Flanke (RF), 5'UTR, 3'UTR, Gen, *egfp* und die Nourseotrizin-Resistenzkassette mit *nos*-Terminator sind eingezeichnet.

Die Expression von Afg3G nahm keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten oder die Morphologie von Sporidien und Filamenten ein. Des Weiteren konnte die *in vivo* Kollokalisierung mit dem Farbstoff *MitoTracker[®] Red* eine eindeutige Lokalisation von Afg3G in Mitochondrien von Sporidien und acht Stunden induzierten Filamenten nachweisen (Abb. 12A und B; Mahler *et al.*, 2009). Dementsprechend konnte Afg3 als Mitochondrienprotein bestätigt werden. In AB33afg3G und AB33afg3G/*rrm4*Δ konnte keine zytoplasmatische Lokalisation von Afg3G detektiert werden. Die Gfp-Fluoreszenzaufnahmen ließen eine gesteigerte Afg3G-Expression in *rrm4*Δ-Filamenten vermuten.

Die mit der gleichen Klonierungsstrategie hergestellten Stämme AB33nuo2G und AB33nuo2G/*rrm4*Δ waren ebenfalls im Wachstumsverhalten und in der Morphologie von Sporidien und Filamenten nicht beeinträchtigt (Abb. 13A und B). Anhand der *MitoTracker[®] Red*-Färbung konnte die Lokalisation von Nuo2G in beiden Stämmen eindeutig den Mitochondrien zugeordnet werden. Auffällig war die zusätzliche zytoplasmatische Lokalisation von Nuo2G, welche besonders in *rrm4*Δ-Filamenten zu beobachten war (Abb. 13B). In diesen Filamenten schien es eine stark verringerte Mitochondrien-Lokalisation zu geben. Diese Beobachtung stimmte mit dem Ergebnis der differentiellen Proteom-Analyse überein, die besagte, dass in *rrm4*Δ-Filamenten eine Abnahme von Nuo2 in der Membran-assoziierten Proteinfraction vorliegt.

Die Expression des dritten Fusionsproteins, Atp4G, zeigte in Sporidien ein deutlich verlangsamtes Wachstum und einen Defekt in der ansonsten zigarrenförmigen Morphologie des Pilzes. Die Sporidien der beiden Stämme AB33atp4G und AB33atp4G/*rrm4*Δ sahen unförmig und aufgetrieben aus (Abb. 14A). Nach achtstündiger Induktion des filamentösen

Wachstums war der Stamm AB33atp4G nicht in der Lage, lange wildtypische Filamente auszubilden (Abb. 14B). Zusätzlich zeigte AB33atp4G/rrm4 Δ stark beeinträchtigtes, bipolares Wachstum. Die Filamente wie auch die Sporidien zeigten in beiden Stämmen eine unkontinuierliche, wellige und abnormale Morphologie auf. Das Fusionsprotein Atp4G schien aufgrund des stark gestörten Phänotyps von AB33atp4G nicht funktional zu sein, d.h. eine weitere Charakterisierung des Proteins war mit diesen Stämmen nicht möglich. Die *MitoTracker*[®] Red-Färbung sowie die Lokalisation von Atp4G wiesen keine eindeutigen Mitochondrien-Strukturen auf (Abb. 14A und B). Demnach führte die Expression dieses nicht funktionellen Mitochondrienproteins zu einer Veränderung der Mitochondrien-Morphologie. Eine Aussage über eine eventuelle Kolo­kalisation konnte also nicht getroffen werden.

Diese initiale Analyse der subzellulären Lokalisation mittels C-terminaler eGfp-Fusion resultierte in einer eindeutigen mitochondriellen Lokalisation der Afg3-Protease. Dementsprechend wurde im Verlauf dieser Arbeit die mitochondrielle Afg3-Protease näher charakterisiert.

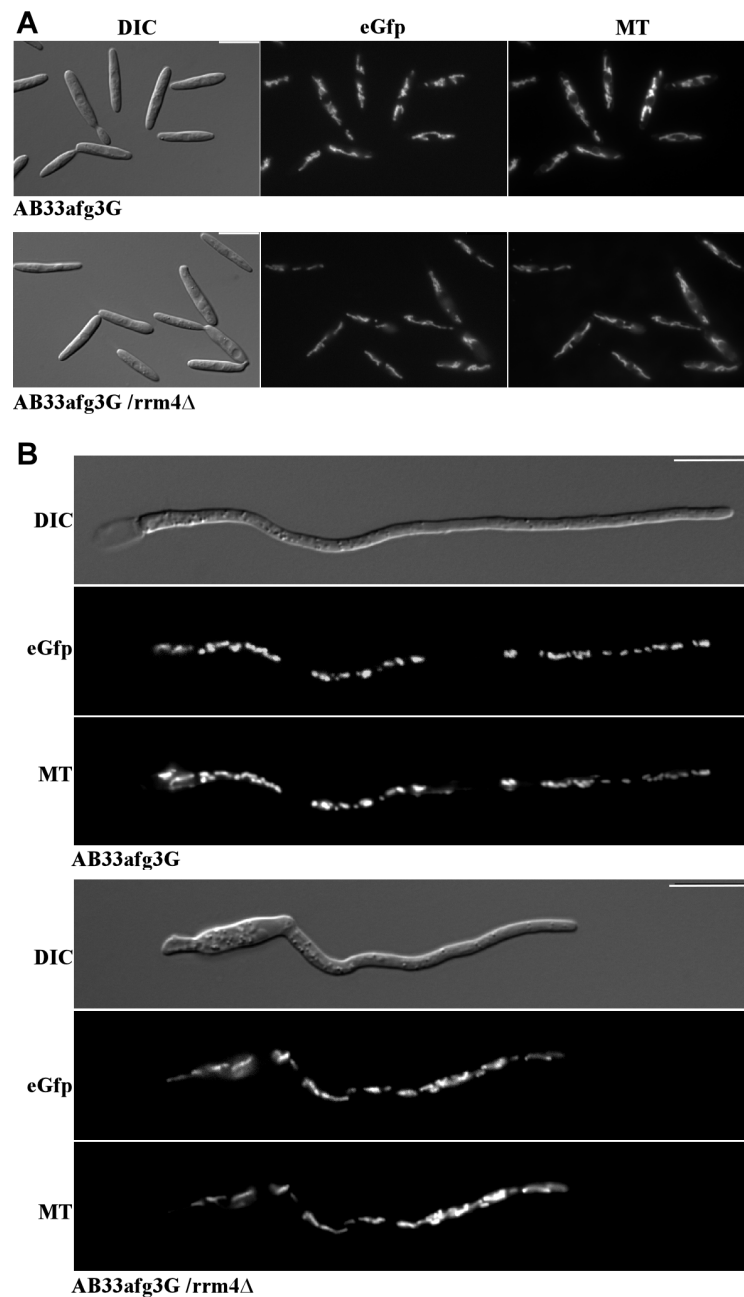


Abbildung 12: Die Lokalisation von Afg3G in AB33 und AB33rrm4Δ. (A) Darstellung von DIC- und Fluoreszenzaufnahmen von mit *MitoTracker® Red CM-H₂XRos* (MT) behandelten haploiden Sporidien der Stämme AB33afg3G und AB33afg3G/rrm4Δ. (B) Darstellung von DIC- und Fluoreszenzaufnahmen von mit *MitoTracker® Red* behandelten, acht Stunden induzierten Filamenten der Stämme AB33afg3G und AB33afg3G/rrm4Δ. Größenmaßstab = 10 µm.

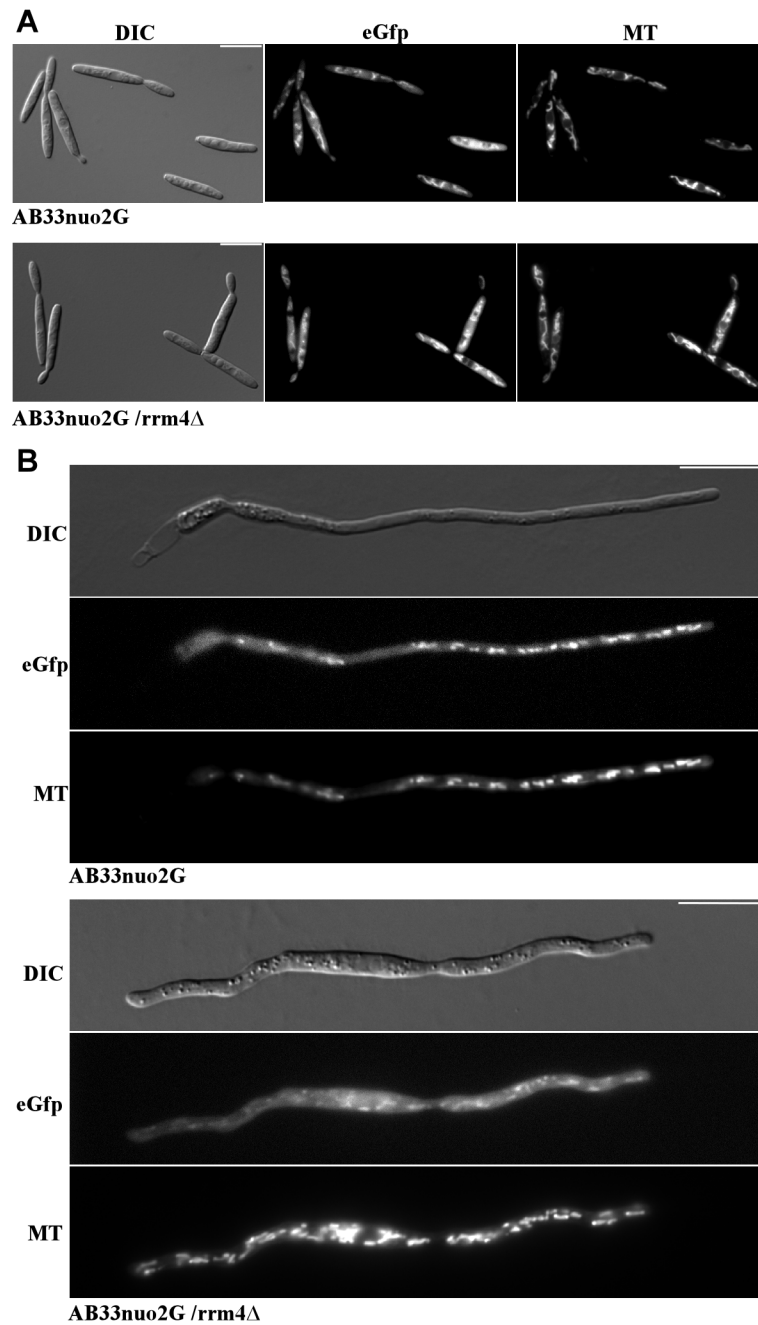


Abbildung 13: Die Lokalisation von Nuo2G in AB33 und AB33rrm4Δ. (A) Darstellung von DIC- und Fluoreszenzaufnahmen von mit *MitoTracker® Red CM-H₂XRos* (MT) behandelten haploiden Sporidien der Stämme AB33nuo2G und AB33nuo2G/rrm4Δ. (B) Darstellung von DIC- und Fluoreszenzaufnahmen von mit *MitoTracker® Red* behandelten, acht Stunden induzierten Filamenten der Stämme AB33nuo2G und AB33nuo2G/rrm4Δ. Größenmaßstab = 10 µm.

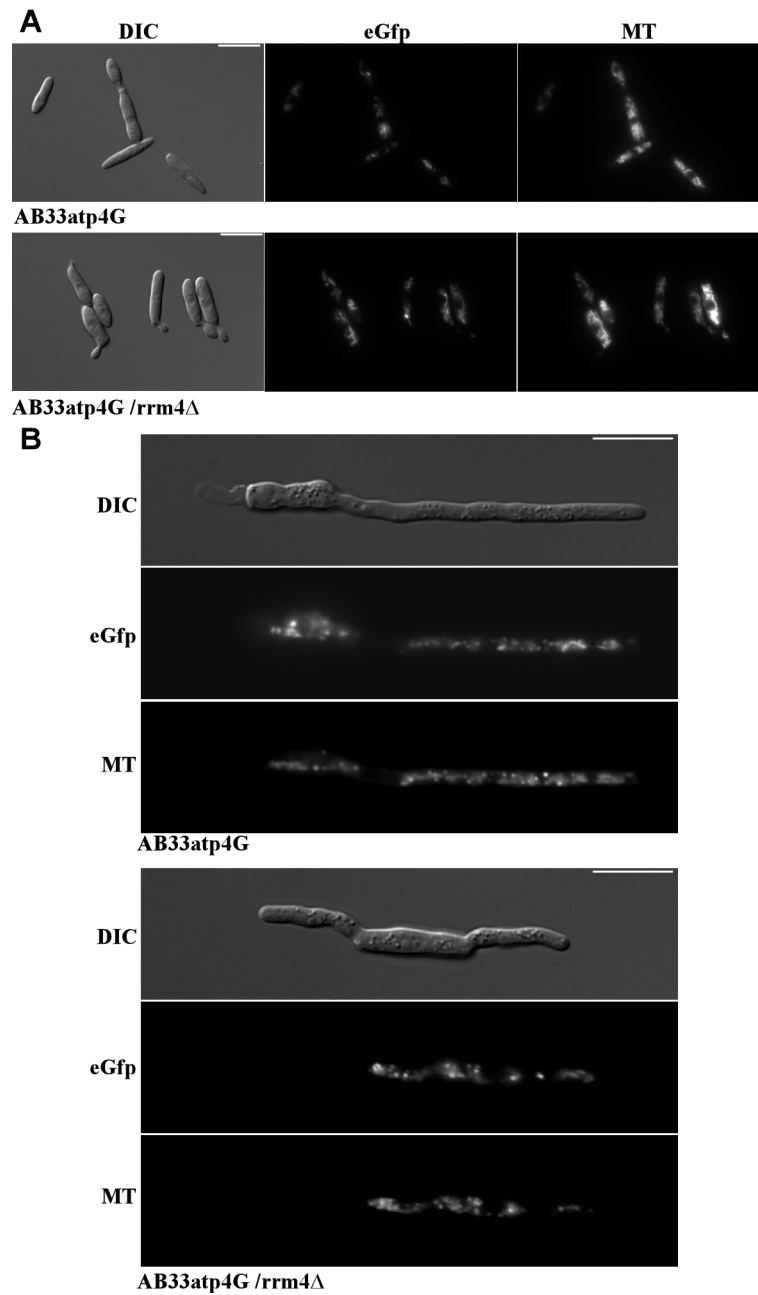


Abbildung 14: Die Lokalisation von Atp4G in AB33 und AB33rrm4Δ. (A) Darstellung von DIC- und Fluoreszenzaufnahmen von mit *MitoTracker*[®] Red CM-H₂XRos (MT) behandelten haploiden Sporidien der Stämme AB33atp4G und AB33atp4G/rrm4Δ. (B) Darstellung von DIC und Fluoreszenzaufnahmen von mit *MitoTracker*[®] Red behandelten, acht Stunden induzierten Filamenten der Stämme AB33atp4G und AB33atp4G/rrm4Δ. Größenmaßstab = 10 μm.

2.10 Das Protein Afg3 ist in Mitochondrien von *rrm4Δ*-Filamenten höher exprimiert

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Filamenten der beiden Afg3G-exprimierenden Stämme und die Daten aus der differentiellen Proteom-Analyse ließen eine Erhöhung des Fluoreszenzsignals von Afg3G im *rrm4Δ*-Stamm vermuten. Daraufhin wurde das Fluoreszenzsignal in Sporidien- und acht Stunden alte Filament-Kulturen der gleichen optischen Dichte der Stämme AB33afg3G und AB33afg3G/*rrm4Δ* mittels einer relativen Fluoreszenzmessung quantifiziert. Die Messung der relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) aus Sporidien-Kulturen in der exponentiellen Wachstumsphase ergab keinen von der *rrm4*-Deletion abhängigen Unterschied (Abb. 15A). Acht Stunden nach der Induktion des filamentösen Wachstums ließ sich ein Anstieg der Afg3G-Fluoreszenz in AB33afg3G beobachten. Jedoch zeigten *rrm4Δ*-Filamente im Vergleich zu Wildtyp-Filamenten eine eindeutige Erhöhung der RFE. Somit führte der Verlust des RNA-bindenden Proteins Rrm4 nur in induzierten Filamenten zu einem Anstieg der Protease Afg3, hatte aber auf die Expression in Sporidien keinen Einfluss (Abb. 15A).

Zur Bestätigung der erhöhten Afg3-Proteinmenge im *rrm4Δ*-Filament wurde eine fraktionierte Western-Analyse der Stämme AB33afg3G und AB33afg3G/*rrm4Δ* mit einem α -Gfp-Antikörper durchgeführt. Die Proteinproben wurden der differentiellen Proteom-Analyse entsprechend hergestellt und fraktioniert (Diplomarbeit J. Koepke, 2005; siehe Material und Methoden). Analysiert wurden Proteinproben aus acht Stunden induzierten Filamenten. Die Untersuchung des Gesamtzellextraktes und der zytoplasmatischen Proteinfraction ergab in *rrm4Δ*-Filament eine deutliche Erhöhung des bei ca. 120 kDa detektierten, vollständigen Fusionsproteins Afg3G (Abb. 15B). Ein drastischer Anstieg von Afg3G konnte in diesem Stamm in der Membran-assoziierten Proteinfraction detektiert werden, womit das Ergebnis der differentiellen Proteom-Analyse bestätigt werden konnte (Abb. 15B). Eine zusätzliche Untersuchung von Afg3G aus aufgereinigten und fraktionierten Mitochondrien (siehe Material und Methoden; Mahlert *et al.*, 2009) beider Stämme konnte die erhöhte Proteinmenge in Mitochondrien des *rrm4Δ*-Filaments bestätigen (Abb. 15C). Diese Analyse bestätigte eine erhöhte Expression und Mitochondrien-Lokalisation der mitochondriellen Protease Afg3 in Abwesenheit des RNA-bindenden Proteins Rrm4 während der Filamentbildung.

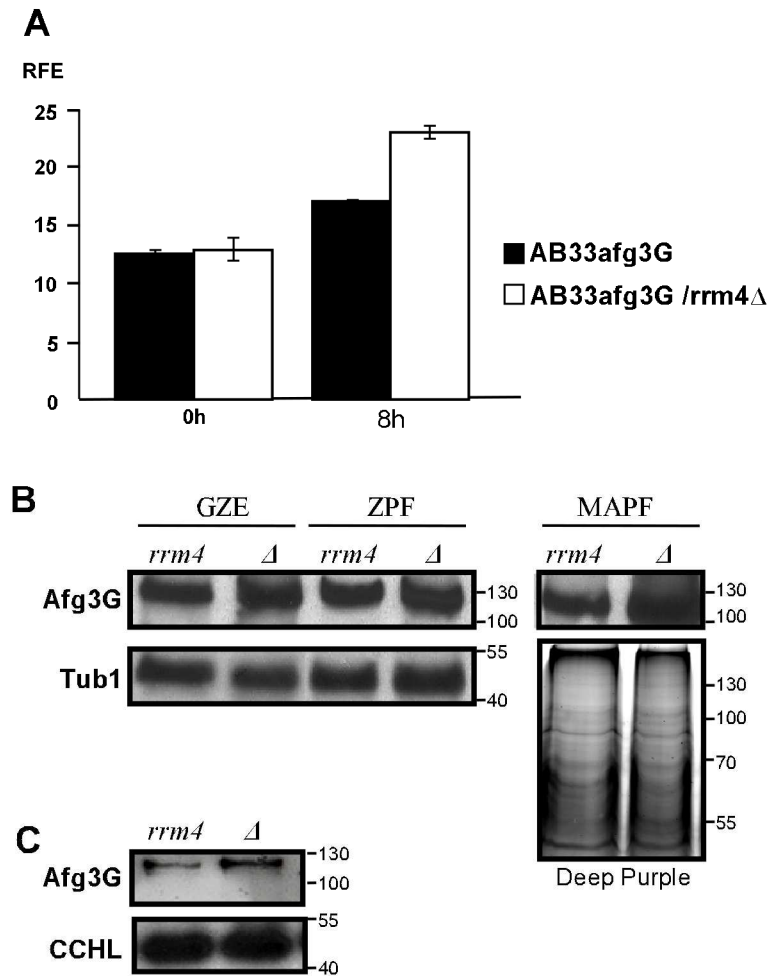


Abbildung 15: Erhöhte Afg3G Expression in *rrm4Δ*-Filamenten. (**A**) Graphische Darstellung der Messung von relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) von Kulturen knospender Sporidien und acht Stunden induzierter Filamente der Stämme AB33afg3G und AB33afg3G/*rrm4Δ* ($OD_{600} = 0,5$). Das gemessene Fluoreszenzsignal von Afg3G ist in Sporidien (0 h) beider Stämme vergleichbar, jedoch lässt sich in induzierten Filamenten (8 h) eine eindeutige Abhängigkeit von Rrm4 erkennen. In *rrm4Δ*-Filamenten kommt es zu einer erhöhten Afg3G-Expression. (**B**) Fraktionierte Western-Analyse von Filamenten der Stämme AB33afg3G und AB33afg3G/*rrm4Δ*. Darstellung des Gesamtzellextrakts (GZE), der zytoplasmatische Proteinfraction (ZPF) und der Membran-assoziierte Proteinfraction (MAPF). (**C**) Western-Analyse von isolierten Mitochondrien aus Filamenten der Stämme AB33afg3G und AB33afg3G/*rrm4Δ*. Bezeichnung der detektierten Proteine links, Proteingrößenmarker rechts (kD). Die Detektion von α -Tubulin (Tub1), Cytochrom C-Hämlyase (CCHL) und die Proteinfärbung mit *Deep Purple* (GE Healthcare) dienen als Ladekontrolle.

2.11 Die *rrm4*-Deletion führt in Filamenten zu einer Erhöhung der reaktiven Sauerstoffproduktion in Mitochondrien

Die bestätigte Erhöhung der Afg3-Protease in *rrm4* Δ -Filamenten zusammen mit den Daten aus der Proteomanalyse, welche eine Verringerung der Proteinmenge der Untereinheiten Nuo2 und Atp4 aus Komplex I und V identifizierte, könnten Hinweise auf eine veränderte Funktion der mitochondrialen Komplexe der Atmungskette sein. Eine Analyse der Mitochondrien-Aktivität mit dem Redox-Indikator *AlamarBlue*® (Invitrogen) konnte eine Veränderung in acht Stunden induzierten Filamenten jedoch nicht eindeutig feststellen (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Funktion von Mitochondrien ist die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), welche ein physiologisches Nebenprodukt der oxidativen Phosphorylierung darstellen. Insbesondere wird dabei Superoxid gebildet. Die ROS-Produktion fungiert als Mediator der Redox-Signaltransduktion vom Organell zum Rest der eukaryontischen Zelle (Droge, 2002). Der verhältnismäßig größte Anteil an Superoxid in Mitochondrien wird von Komplex I (NADH-Q-Oxidoreduktase) produziert (Murphy, 2009; Grivennikova & Vinogradov, 2006).

Der rot fluoreszierende Mitochondrien-Superoxid-Indikator *MitoSOX*TM *Red* (Invitrogen) ermöglichte eine Analyse der mitochondrialen ROS-Produktion *in vivo*, da er spezifisch für Mitochondrien ist und nur dort selektiv durch Superoxid oxidiert werden kann. Die Detektion von Superoxid mit *MitoSOX*TM *Red* ergab punktförmige Fluoreszenz-Signale in den Mitochondrien. Beim visuellen Vergleich von Filamenten der beiden Stämme AB33 und AB33*rrm4* Δ schienen die Superoxid-Signale in *rrm4* Δ -Filamenten stärker zu sein (Abb. 16A). Diese Beobachtung konnte in Mischexperimenten der Stamm-Kombinationen AB33 mit AB33afg3G/*rrm4* Δ und AB33*rrm4* Δ mit AB33afg3G bestätigt werden (Abb.16B). Es ließ sich eine deutliche Erhöhung der Superoxid-Produktion in Filamenten der beiden *rrm4* Δ -Stämme erkennen. Um diesen Unterschied zu quantifizieren, wurde eine Fluorimeter-Analyse durchgeführt. Hierzu wurden Sporidien-Kulturen der Stämme AB33, AB33*rrm4* Δ , AB33afg3G und AB33afg3G/*rrm4* Δ in der exponentiellen Wachstumsphase auf eine OD₆₀₀ von 0,5 eingestellt und mit dem Superoxid-Indikator *MitoSOX*TM *Red* behandelt. Zusätzlich wurde die Superoxid-Produktion durch den Komplex I-Inhibitor Rotenon induziert, um mögliche Effekte der *rrm4*-Deletion zu verstärken. Rotenon ist ein Pyranofurochromon-Derivat und blockiert die Bindestelle von Coenzym Q (CoQ, Ubichinon), wodurch die Rückführung der Elektronen zum Flavinmononukleotid (FMN) zu einer gesteigerten Superoxid-Produktion führt (Votyakova & Reynolds, 2001).

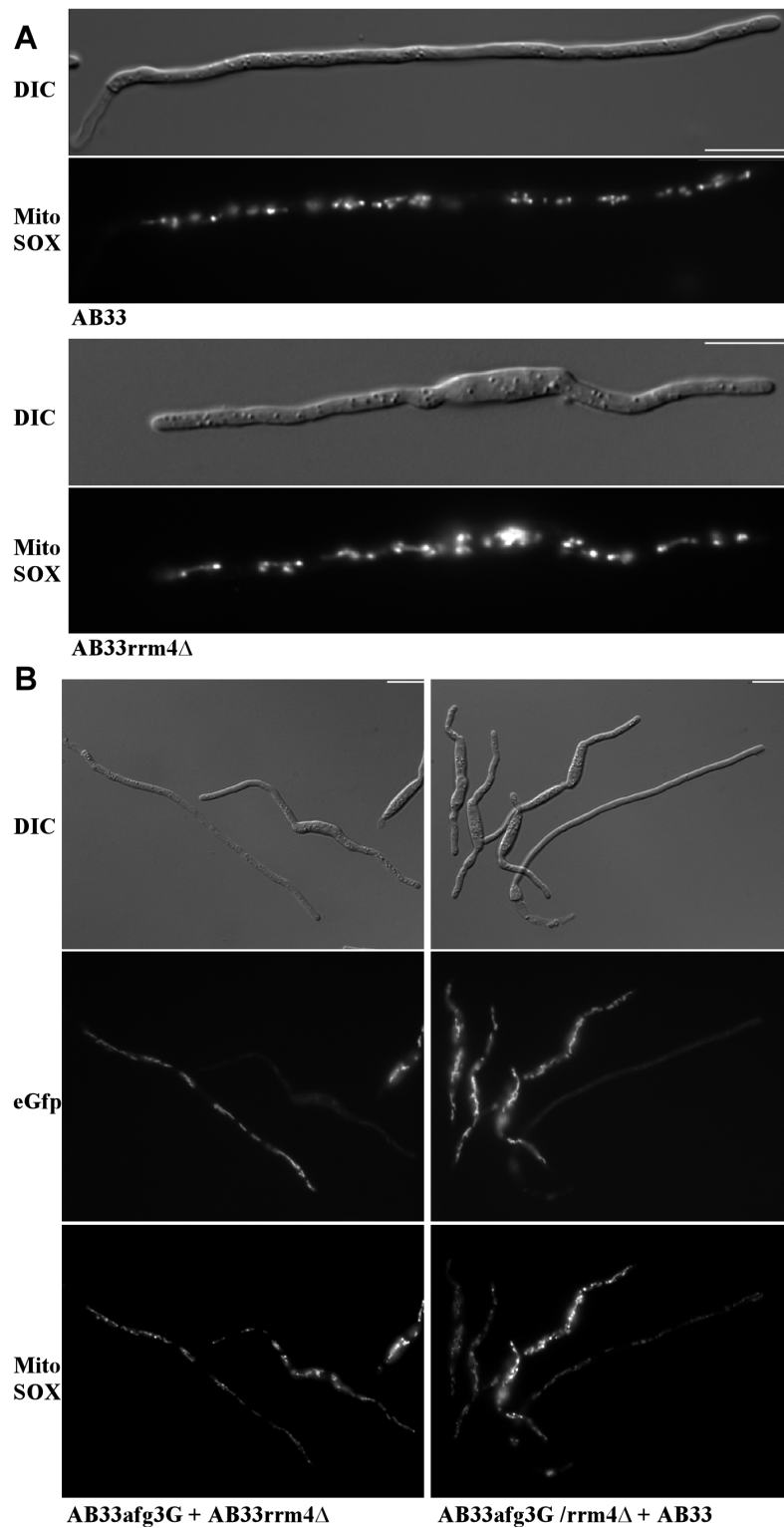


Abbildung 16: Detektion von Komplext-abhängiger reaktiver Sauerstoffproduktion (ROS) in Filamenten. (A) Darstellung von DIC- und Fluoreszenzaufnahmen von mit *MitoSOXTM RED* behandelten, acht Stunden induzierten Filamenten der Stämme AB33 und AB33rrm4Δ. (B) Darstellung von DIC- und Fluoreszenzaufnahmen von mit *MitoSOXTM RED* behandelten, acht Stunden induzierten Filamenten der Stämme AB33 mit AB33afg3G/rrm4Δ und AB33afg3G mit AB33rrm4Δ in einem Mischexperiment. Größenmaßstab = 10 µm.

Die Kulturen für die Induzierung der Superoxid-Produktion wurden vor der Messung 20 Minuten mit 2 μ M Rotenon inkubiert. Es konnte in allen Sporidien-Kulturen eine vom Inhibitor Rotenon induzierte Superoxid-Erhöhung beobachtet werden. Dabei zeigten die Sporidien der unterschiedlichen Stämme keine Unterschiede in der Superoxid-Produktion (Abb. 17A). Nach acht Stunden Induktion der Filamentbildung ließen sich jedoch eindeutige Unterschiede in der Superoxid-Produktion der untersuchten Stämme erkennen. Sowohl AB33rrm4 Δ als auch AB33afg3/rrm4 Δ wiesen eine gesteigerte Superoxid-Produktion auf (Abb. 17B). Überraschenderweise verhielten sich die Filamente dieser Stämme durch die Behandlung mit Rotenon kontrovers zu den zunächst erwarteten Ergebnissen einer Rotenon-induzierten Erhöhung der Superoxid-Produktion. Die analysierten rrm4 Δ -Stämme zeigten nach Induktion des filamentösen Wachstums und Inhibierung des Komplex I durch Rotenon eine verminderte Superoxid-Produktion (Abb. 17B). Die Wildtyp-Filamente wiesen hingegen, wie auch die Sporidien, eine erhöhte Superoxid-Produktion nach Inhibierung mit Rotenon auf. Demnach scheint die Inhibierung von Komplex I in rrm4 Δ -Filamenten nicht den erwarteten Effekt hervorzurufen, was auf eine Fehl-Assemblierung des Komplex I in diesen Filamenten zurückzuführen sein könnte.

Zusammenfassend deckte die Identifizierung der Mitochondrien-Proteine aus der Proteom-Analyse eine Fehlfunktion der Mitochondrien in rrm4 Δ -Filamenten auf. Die erhöhte Proteinmenge der Protease Afg3 lieferte einen Hinweis auf verstärkten Proteinabbau oder Assemblierungsdefekte der Protein-Komplexe in der inneren Mitochondrienmembran. Eine Dysfunktion der Mitochondrien konnte anhand einer gesteigerten Superoxid-Produktion in rrm4 Δ -Filamenten eindeutig nachgewiesen werden. Dies ist auf einen Defekt von Komplex I zurückzuführen, was durch die verringerte Superoxid-Produktion nach der Behandlung mit Rotenon bestätigt werden konnte.

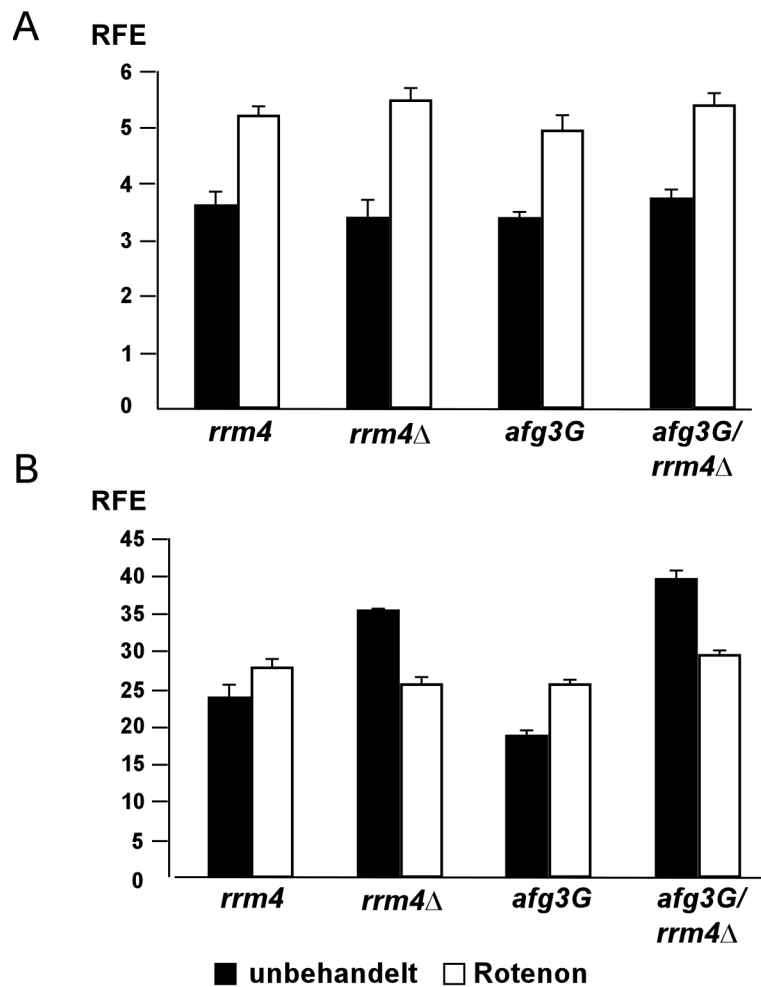


Abbildung 17: Erhöhte Superoxid-Produktion in *rrm4*Δ-Filamenten. (A) Graphische Darstellung der Messung von relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) von MitoSOX™ RED behandelten Kulturen knospender Sporidien der Stämme AB33 (*rrm4*), AB33*rrm4*Δ (*rrm4*Δ), AB33*afg3G* (*afg3G*) und AB33*afg3G/rrm4*Δ (*afg3G/rrm4*Δ) bei gleicher optischer Dichte ($OD_{600} = 0,5$; schwarze Balken). Zusätzlich wurden die Kulturen 30 Minuten mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon behandelt (weiße Balken). (B) Graphische Darstellung der Messung von relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) von MitoSOX™ RED behandelten Kulturen acht Stunden induzierter Filamente der oben aufgeführten Stämme bei gleicher optischer Dichte ($OD_{600} = 0,5$; schwarze Balken). Zusätzlich wurden die Kulturen 30 Minuten mit dem Komplex I-Inhibitor Rotenon behandelt (weiße Balken).

2.12 Charakterisierung und Lokalisation des ribosomalen Proteins Rps19

Das schon während der Diplomarbeit (J. Koepke, 2005) identifizierte ribosomale Protein Rps19 (Nr.1: um11551, *Ribosomal protein S19*, MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) konnte anhand einer massenspektrometrischen Analyse erneut eindeutig bestätigt werden. Rps19 ist 159 Aminosäuren lang, besitzt ein Molekulargewicht von 17,8 kDa, einen vorgeschlagenen pI bei 5,1 und konnte anhand von vier Peptiden mit einer Sequenzabdeckung von 36,5% identifiziert werden. Die Position der identifizierten Protein-Spezies im 2D-Gel stimmte mit den vorhergesagten Angaben für das vollständige Protein überein, obgleich keine Peptide vom C-Terminus des Proteins in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert werden konnten.

Für eine vorläufige Charakterisierung des ribosomalen Proteins Rps19 wurden erste Lokalisationsstudien durchgeführt. Hierzu wurden die Stämme AB33rps19G und AB33rps19G/rrm4 Δ generiert, welche Rps19 mit C-terminaler Fusion von eGfp (Rps19G) unter dem endogenen Promotor exprimierten. Die Stämme wurden mittels des SfiI-abhängigen Kassetten-Systems über homologe Rekombination aus den Ausgangsstämmen AB33 und AB33rrm4 Δ hergestellt (Brachmann *et al.*, 2004; siehe Material und Methoden). Beide Stämme zeigten ein extrem beeinträchtigtes, vegetatives Wachstum, und die ansonsten zigarrenförmige Morphologie des Pilzes (siehe Abb. 8A) wies leichte Verformungen auf (Abb. 18A). Diese erste Analyse legte nahe, dass das ribosomale Protein Rps19 eine entscheidende Rolle schon während dem Wachstum von Sporidien einnimmt und dass das Fusionsprotein Rps19G demnach nicht funktionell war. Dementsprechend wiesen auch die analysierten Filamente Wachstumsdefekte auf, d.h. nur wenige Sporidien reagierten auf den Medienwechsel und waren erst nach 24 Stunden in der Lage filamentös auszuwachsen (Abb. 18B). In knospenden Sporidien beider Stämme konnte ein gleichmäßig verteiltes, zytoplasmatisches Fluoreszenzsignal beobachtet werden, wobei der Nukleus keine Fluoreszenz aufwies. In induzierten Filamenten war ebenfalls eine zytoplasmatische Lokalisation von Rps19G zu beobachten. Interessanterweise konnte in Filamenten des Stammes AB33rps19G eine gleichmäßig verteilte Fluoreszenz detektiert werden, während in bipolar auswachsenden rrm4 Δ -Filamenten die Fluoreszenz von Rps19G zu den Polen hin abzunehmen schien. Diese initialen Beobachtungen der subzellulären Lokalisation müssen jedoch wegen dem Funktionsverlust von Rps19G mit Vorsicht interpretiert werden. Aufgrund des auffälligen Wachstumsdefektes konnte mit diesen Stämmen keine weiteren Analysen durchgeführt werden. Ob es sich hierbei um einen pleiotropen Phänotyp, bedingt durch verminderte Translation, oder um einen

spezifischen Defekt während des vegetativen und filamentösen Wachstums handelt müsste anhand detaillierterer Analysen aufgeklärt werden.

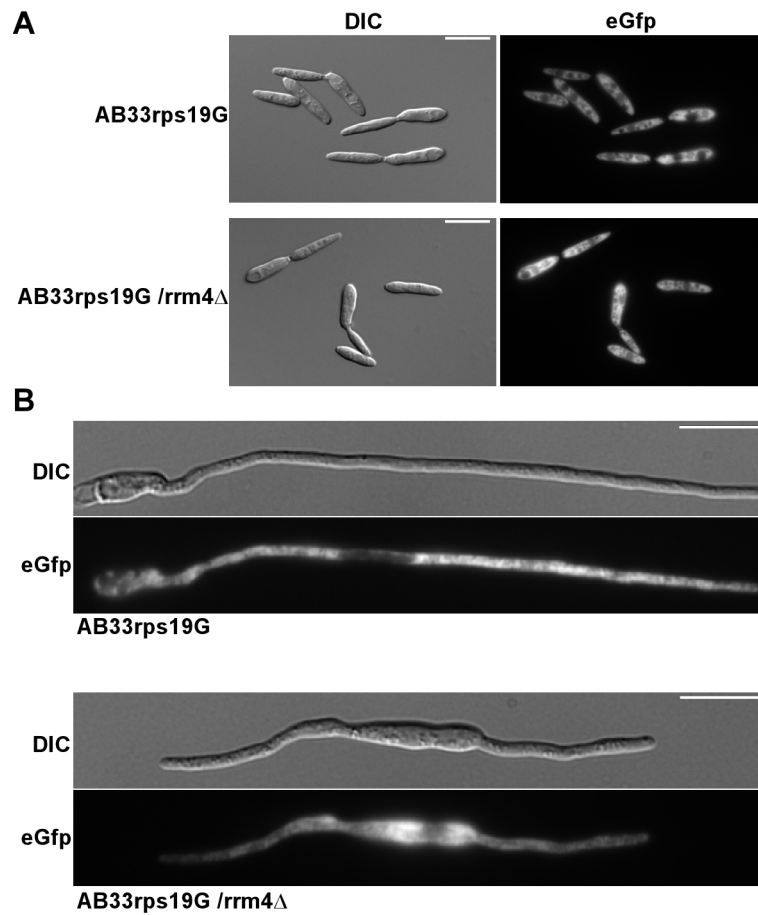


Abbildung 18: Die Lokalisation des ribosomalen Proteins Rps19. Darstellung von DIC- und Fluoreszenzaufnahmen von (A) knospenden, haploiden Sporidien und (B) acht Stunden induzierten Filamenten der Stämme AB33rps19G und AB33rps19G/rrm4Δ. Größenmaßstab = 10 µm.

2.13 Komplementation von Pab1 in *S. cerevisiae*

Für eine subzelluläre Lokalisation von mRNAs in Filamenten wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Analyse des putativen Poly-(A)-bindende Proteins aus *U. maydis* durchgeführt. Das Poly-(A)-bindende Protein bindet an den Poly-(A)-Anhang der 3'UTR vieler, wenn nicht aller, eukaryotischer mRNAs (Hogan *et al.*, 2008) und kann daher als molekularer Marker benutzt werden, um die Lokalisation von mRNAs zu untersuchen. Pab1 aus *U. maydis* (um03494; *probable PAB1 - mRNA polyadenylate-binding protein*; MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>) ist ein 651 Aminosäuren langes Protein und besitzt eine charakteristische Domänenstruktur bestehend aus vier N-terminalen RRM-Domänen und einer C-terminalen MLLE-Domäne (um03494, MUMDB, <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago>; (Kozlov *et al.*, 2004; Kozlov *et al.*, 2010). Zur Verifizierung der Pab1-Funktion wurden Fluoreszenz-markierte Versionen von Pab1 hergestellt und in einem *S. cerevisiae*-Stamm getestet, welcher ein mutiertes *pab1-53^{ts}* trägt. Dieser Stamm zeigt ein Temperatur-sensitives Wachstumsverhalten bei 28°C (Abb. 19A). Die reduzierte Wachstumsrate wurde einerseits mit dem Poly-(A)-bindenden Protein aus *S. cerevisiae*, ScPab1, und andererseits mit Pab1G (Pab1 C-terminal mit eGfp fusioniert; König *et al.*, 2009) und Pab1R (Pab1 C-terminal mit Rfp fusioniert; Campbell *et al.*, 2002; König *et al.*, 2009) aus *U. maydis* komplementiert (Abb. 19A). Des Weiteren wurde auch Rrm4G (Rrm4 C-terminal mit eGfp fusioniert) in diesem Komplementations-Test überprüft, da wegen der ähnlichen Domänenstruktur eine redundante Funktion vorliegen könnte (Becht *et al.*, 2006). Alle Konstrukte wurden als frei-replizierende Plasmide transformiert.

Die Expression der hier untersuchten Fusionsproteine wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie der transformierten Stämme überprüft. Die Fusionsproteine Pab1G, Pab1R und Rrm4G aus *U. maydis* zeigten alle eine zytoplasmatische Lokalisation in Hefe (Abb. 19B). Sowohl ScPab1 als auch die fluoreszierenden Fusionsproteine Pab1G und Pab1R aus *U. maydis* konnten den reduzierten Wachstums-Phänotyp bei 28°C komplementieren (Abb. 19A). Demnach fungiert Pab1 aus *U. maydis* als Poly-(A)-bindendes Protein in *S. cerevisiae*, und die C-terminalen Fusion an die entsprechenden Fluoreszenzproteine interferiert nicht mit der Funktion des Proteins. Obwohl Rrm4 eine sehr ähnliche Domänen-Architektur aufweist komplementierte das Fusionsprotein Rrm4G nicht den Phänotyp. Demnach besitzt Rrm4 nicht die Funktion eines Poly-(A)-bindenden Proteins in *S. cerevisiae*, (Becht *et al.*, 2006). Folglich wurde um03494 als das Poly-(A)-bindende Protein Pab1 in *U. maydis* identifiziert.

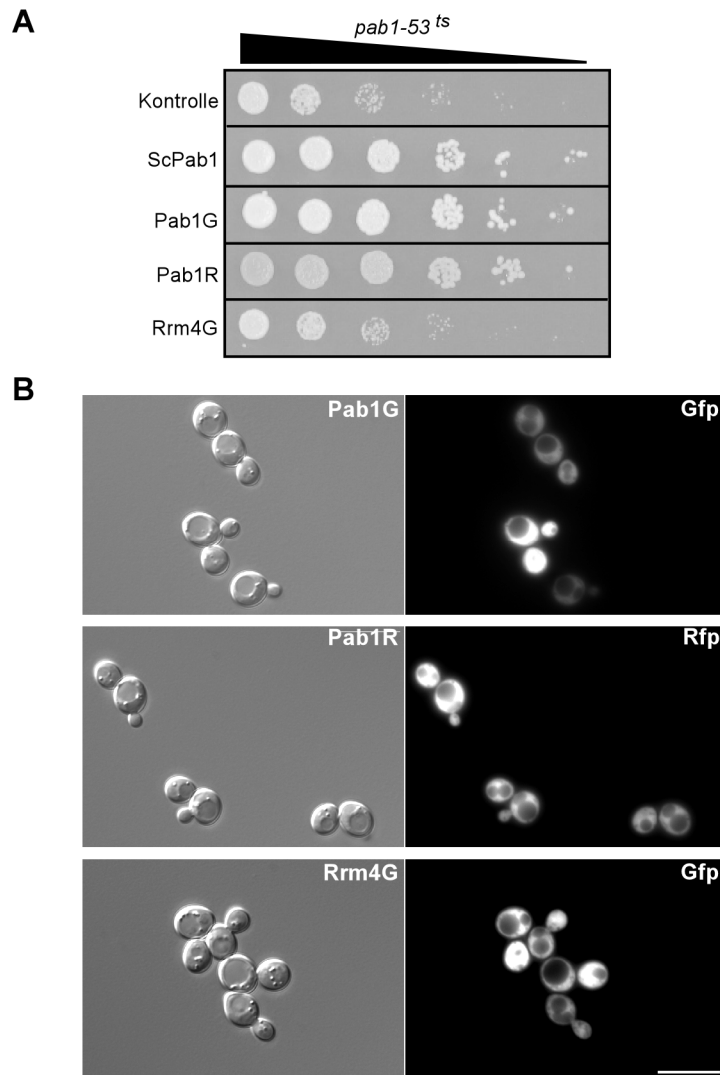


Abbildung 19: Die Komplementationsanalyse in *S. cerevisiae*. (**A**) Darstellung des Wachstumsverhaltens auf Festmedium des temperatursensitiven *S. cerevisiae* Stamms HKY171, welcher eine Mutation in *pab1* (*pab1-53^{ts}*) trägt und reduziertes Wachstum bei 28°C aufweist. Die Expression von ScPab1, UmPab1G, und UmPab1R komplementieren den Wachstumsphänotyp. Rrm4G zeigt keine Komplementation (10fache Verdünnungsreihe). (**B**) Darstellung von DIC- und Fluoreszenzaufnahmen des transformierten Hefestamms. Die Expression von Pab1G, Pab1R und Rrm4G steht unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven *ADH1*-Promotors. Größenmaßstab = 10 µm.

2.14 Lokalisation des Poly-(A)-bindenden Proteins Pab1 in Partikeln

Für die Analyse einer Rrm4-abhängigen Lokalisation von Pab1G in *U. maydis* wurden die Stämme AB33pab1G und AB33pab1G/rrm4 Δ generiert, welche mittels eines SfiI-abhängigen Kassetten-Systems über homologe Rekombination hergestellt wurden (Brachmann *et al.*, 2004; siehe Material und Methoden). In induzierten Wildtyp-Filamenten wies Pab1G eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation auf, wobei der Nukleus deutlich durch seine negative Fluoreszenz erkennbar war (Abb. 18A). Weiterhin ließen sich Partikel-Strukturen erkennen, welche bidirektional im Filament auf definierten Bahnen pendelten (Anhang CD mit Video). Die Überlagerung zweier in den Falschfarben Rot und Grün gefärbter Momentaufnahmen ließ eine bildliche Darstellung der sich bewegenden Partikel zu (Abb. 20A). Durch die Behandlung mit dem Mikrotubuli-Inhibitor Benomyl (50 mM für 20 min) konnte die Partikelbewegung gestoppt werden, was ein erstes Indiz für den Rrm4-vermittelten Mikrotubuli-abhängigen Transportprozess darstellte (Becht *et al.*, 2006; Daten nicht gezeigt). In AB33pab1G/rrm4 Δ -Filamenten konnten zusätzlich zur zytoplasmatischen Lokalisation von Pab1G keine Partikelstrukturen detektiert werden (Abb. 20B; siehe Anhang CD mit Video). Dies wird in der Darstellung der zwei überlagerten Momentaufnahmen deutlich, d.h. im Zeitraum von 0,4 s konnte keine Bewegung detektiert werden. Zusätzlich zum *rrm4*-Deletionsphänotyp konnte eine veränderte zytoplasmatische Lokalisation von Pab1G beobachtet werden. Das Pab1G-Fluoreszenzsignal nahm in den bipolar wachsenden Filamenten zu den Hyphenspitzen hin drastisch ab, während starke Fluoreszenzsignale in der perinukleären Region der Mutterzelle detektierbar waren. In AB33pab1G-Filamenten nahm das Pab1G-Fluoreszenzsignal zur Hyphenspitze hin dagegen nur wenig ab. Das Intensitäts-Verhältnis einer definierten perinukleären Region gegenüber der Hyphenspitze ergab einen signifikanten Unterschied zwischen AB33pab1G (1.4 ± 0.01 Standardabweichung) und AB33pab1G/rrm4 Δ (2.8 ± 0.09 Standardabweichung; p-Wert <0.005, zweiseitiger Student's t-Test; Abb. 20C).

Diese Analyse zeigte, dass Rrm4 für die Verteilung von mRNA-gebundenem Pab1G zuständig ist. Basierend auf dem Fehlen von beweglichen Pab1-Partikeln in *rrm4* Δ -Filamenten konnte Rrm4 als die Haupteinheit für Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transport in Filamenten von *U. maydis* erkannt werden.

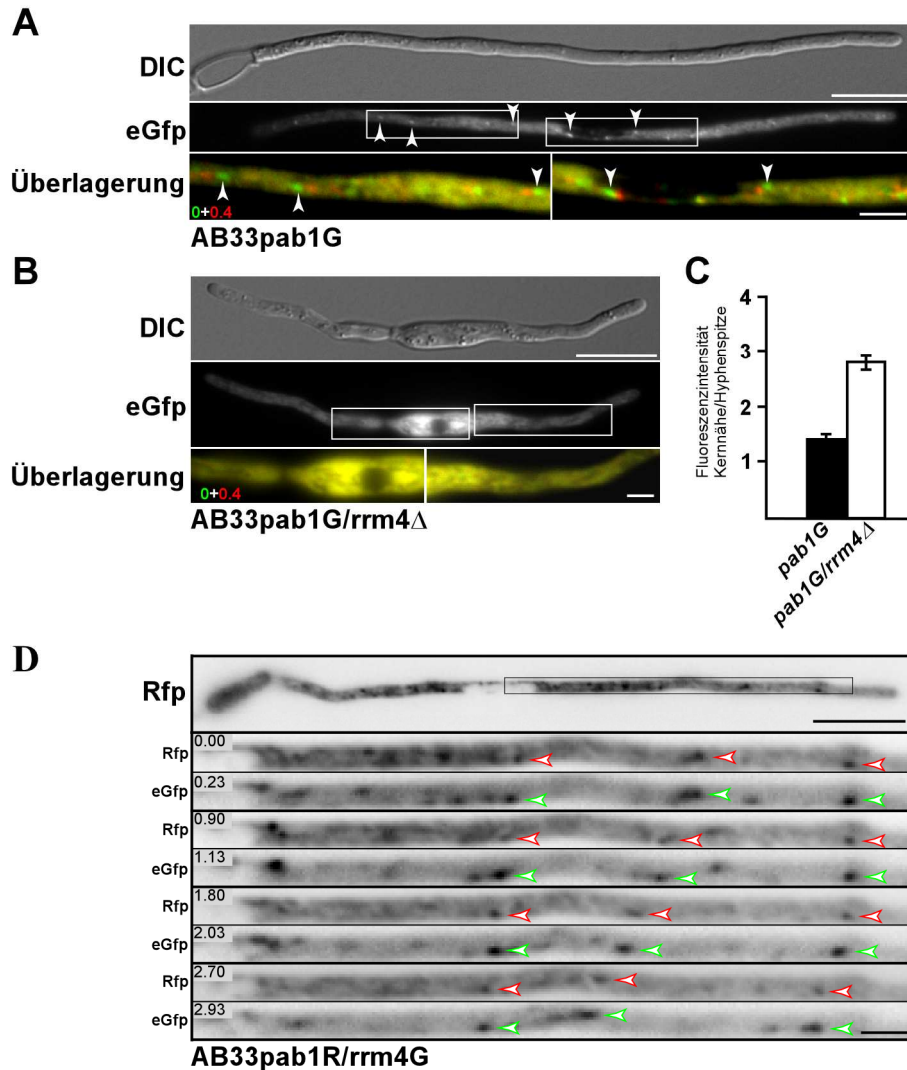


Abbildung 20: Die Ko-Lokalisation von Pab1 and Rrm4. (A) Darstellung von DIC-, Fluoreszenz- und überlagerten Momentaufnahmen von induzierten Filamenten des Stammes AB33pab1G. Die eingezeichneten Rechtecke stellen die unten vergrößerten Regionen dar. Die überlagerten Momentaufnahmen sind eGfp-Bilder des sich im Anhang befindlichen Videos (Video1). Zur Veranschaulichung der Bewegung wurden die beiden Momentaufnahmen, welche 0,4 s voneinander entfernt sind, in den Falschfarben Rot und Grün dargestellt. Die Pfeile markieren die sich bewegenden Partikel (oberer und unterer Größenmaßstab = 10 und 2 μm). (B) Darstellung von DIC-, Fluoreszenz- und überlagerter Momentaufnahmen eines induzierten Filaments des Stammes AB33pab1G/rrm4Δ (Darstellungsform wie in (A), oberer und unterer Größenmaßstab = 10 und 2 μm). Die Momentaufnahmen entstammen dem Video 2, siehe Anhang. (C) Graphische Darstellung des Verhältnisses der durchschnittlichen Pab1G-Fluoreszenzintensitäten zwischen Kernnähe und auswachsender Hyphenspitze in induzierten Filamenten der Stämme AB33pab1G (A) und AB33pab1G/rrm4Δ (B) (Messung einer definierten, perinukleären Region und einer Region in der Hyphenspitze, 45 Filamente pro Stamm wurden analysiert, $n = 3$, $P < 0.005$ im ungepaarten zweiseitigen Student's t-Test). (D) Darstellung von invertierten Gfp- und Rfp-Momentaufnahmen eines induzierten Filaments des Stammes AB33pab1R/rrm4G. Die invertierten Momentaufnahmen wurden mit einem automatisierten Filterrad erstellt. Die eingezeichnete Region ist unterhalb im Wechsel von eGfp und Rfp-Fluoreszenzaufnahmen vergrößert dargestellt. Die Zeitangaben zu den Momentaufnahmen des jeweiligen Fluoreszenzkanals sind links angegeben. Die roten Pfeile markieren die Pab1R-Partikel und die grünen Pfeile die Rrm4G-beinhaltenen Partikel (oberer und unterer Größenmaßstab = 10 und 2 μm).

2.15 Rrm4 und Pab1 kolokalisieren

Basierend auf dem Ergebnis der Rrm4-abhängigen Partikelbildung des Poly-(A)-bindenden Proteins Pab1 sollte in einer Kolokalisationsstudie überprüft werden, ob Pab1 und Rrm4 in denselben pendelnden Partikeln akkumulieren. Hierzu wurde der Stamme AB33pab1R/rrm4G generiert, in dem beide Proteine als C-terminale Fluoreszenzfusionsproteine (Pab1R und Rrm4G) vom endogenen Locus exprimiert werden. Die *in vivo*-Lokalisation in induzierten Filamenten wurde mikroskopisch einerseits mit einem Filterrad analysiert, mit dem man in kurzen Zeitabständen zwischen dem eGfp- und dem Rfp-Fluoreszenzkanal hin- und herschalten kann (Abb. 20D), um die Partikelbewegung von Rrm4G und Pab1R zu verfolgen. Auf der anderen Seite konnte, mit der Hilfe von Sebastian Baumann, mittels einer dualen Fluoreszenz-Detektion eine gleichzeitige Aufnahme beider Fluoreszenz-Kanäle erstellt werden (siehe Anhang Video 3; König *et al.*, 2009). Resultierend aus beiden Analyse-Methoden wurde eindeutig gezeigt, dass Pab1R und Rrm4G in denselben pendelnden Partikeln kolokalisieren. Des Weiteren wurde eine visuelle Auswertung der Kolokalisation angefertigt, welche besagte, dass 97% der Rrm4G-beinhaltenen Partikel mit Pab1R kolokalisieren (10 Videos, 336 von 347 Partikeln kolokalisieren). Diese Analyse konnte zusätzlich anhand einer Koimmunopräzipitation bestätigt werden. (König *et al.*, 2009).

Zusammenfassend konnte Pab1 als Poly-(A)-bindendes Protein bestätigt werden und dementsprechend als molekularer Marker für mRNAs etabliert werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass jeglicher mRNA-Longstreckentransport in Form von mRNPs eine Rrm4-Abhängigkeit aufweist.

3 Diskussion

Der Verlust des RNA-bindenden Proteins Rrm4 führt zu Defekten in der Ausbildung der Polaritätsachse und demnach zu einer gestörten Filamentbildung und einer verminderten Pathogenität. Voruntersuchungen anhand von *Microarray*-Experimenten ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und *rrm4Δ*-Filamenten, wodurch eine Beteiligung von Rrm4 an der Transkription, Reifung oder der Stabilität von bestimmten mRNAs eher auszuschließen ist (P. Becht, M. Scherer, J. Kämper und M. Feldbrügge, persönliche Mitteilung). Die Identifizierung bestimmter Ziel-mRNAs von Rrm4 bestätigte die Beteiligung von Rrm4 an mRNA-Longstreckentransportprozessen verschiedener Transkripte in Filamenten (König *et al.*, 2009). Zielsetzung dieser Arbeit war es, anhand einer Proteom-Analyse die molekularen Unterschiede zwischen Wildtyp- und *rrm4Δ*-Filamenten zu identifizieren und somit zur Aufklärung der posttranskriptionellen Funktion von Rrm4 während des mRNA-Transports beizutragen.

Die erste Proteom-Analyse wurde in *U. maydis* angewendet, um den Morphologie-Wechsel von der knospenden Sporidie zum Filament zu untersuchen. In dieser Analyse wurde nur die zytosolische Proteinfraction in Betracht genommen (Böhmer *et al.*, 2007). Demnach basiert die vorliegende Arbeit auf der ersten DIGE-Analyse fraktionierter Proteinproben in *U. maydis*, welche zum Auffinden von zehn differentiell exprimierten Proteinen-Spezies in Abwesenheit des RNA-bindenden Proteins Rrm4 führte (Diplomarbeit J. Koepke, 2005). Diese spezielle Technik wurde etabliert, um differentielle Proteom-Analysen zu optimieren (Unlü *et al.*, 1997; Westermeier & Scheibe, 2008). Anhand von initialen massenspektrometrischen Analysen wurden zwei Protein-Varianten der Endochitinase Cts1 und das ribosomale Proteine Rps19 identifiziert (Diplomarbeit J. Koepke, 2005). Die in dieser Arbeit durchgeführte erneute Analyse der Membran-assoziierten Proteinfraction mittels präparativer 2D-SDS-Gele führte einerseits zur Bestätigung der vorherigen massenspektrometrischen Analyse und andererseits zur Identifizierung von vier weiteren Protein-Varianten. Damit konnten sieben der zehn differentiell exprimierten Protein-Varianten identifiziert werden: drei Protein-Varianten der Endochitinase Cts1, die drei mitochondriellen Proteinen Atp4, Nuo2, Afg3 und das ribosomale Protein Rps19. Eine detaillierte Analyse der Endochitinase Cts1 bestätigte die Ergebnisse der differentiellen Proteom-Analyse und demonstrierte zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen posttranskriptioneller Regulation und Sekretion in filamentösen Pilzen. Die hier ermittelten Daten sind konsistent mit der Hypothese, dass der Rrm4-abhängige mRNA-Transport wichtig für die apikale Sekretion der Chitinase Cts1 ist. Die

zusätzliche Identifizierung von drei mitochondriellen Proteinen, die Bestätigung der differentiell exprimierten Protease Apg3 und die gesteigerte Superoxid-Produktion deckten einen Defekt in der mitochondriellen Atmungskette in *rrm4Δ*-Filamenten auf. Die zusätzlich durchgeführten Lokalisationstudien des Poly-(A)-bindenden Proteins Pab1 charakterisierten das RNA-bindende Protein Rrm4 als Haupttransporteinheit für den Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transport in *U. maydis*.

3.1 Die Rrm4-abhängige Sekretion der Endochitinase Cts1

In Pilzen besitzen Chitinasen autolytische Funktionen, dienen dem Nährstoffbedarf und weisen morphologische Funktionen während des Zellwandumbaus z. B. beim Spitzenwachstum und der Verzweigung von Hyphen oder der Keimung und Differenzierung von Sporen auf (Kuranda & Robbins, 1991; Adams, 2004). Die meisten Pilze kodieren für mehrere Chitinasen. So besitzt z. B. *Candida albicans* vier Chitinasen, *Aspergillus fumigates* 12 und *Trichoderma reesei* 18 (Seidl *et al.*, 2005; Taib *et al.*, 2005; Dunkler *et al.*, 2005). Eine detaillierte Charakterisierung der biologischen Funktion von pilzlichen Chitinasen ist wegen möglicher funktioneller Redundanz sehr schwierig und dementsprechend in den meisten Fällen nicht vorhanden. Cts1p aus *S. cerevisiae* und Cht3 aus *C. albicans* gehören zu den wenigen Beispielen, wo eine definierte Funktion bestimmt werden konnte. Beiden Chitinasen konnte, anhand von Deletionsanalysen, eine spezifische Funktion in der Degradierung der Zellwand der Mutter/Tochter-Verbindung während der Knospung zugeordnet werden (Dunkler *et al.*, 2005; Kuranda & Robbins, 1991). Dagegen führte in filamentösen Pilzen die Deletion von *chiB1* aus *A. fumigates*, *cts1* aus *C. immitis* oder *chs1-4* aus *C. albicans* zu keinen Mutationsphänotypen während des polaren Wachstums (Dunkler *et al.*, 2005; Jaques *et al.*, 2003 Reichard *et al.*, 2000).

Das Genom von *U. maydis* beinhaltet nur vier Gene kodierend für chitinolytische Enzyme. Es wurden die drei Gene *cts1*, *um06190* und *um02758*, kodierend für putative Endochitinasen der Glykosyl-Hydrolase-Familie 18 und zusätzlich eine putative Exochitinase, *um00695*, der Glykosyl-Hydrolase-Familie 20 identifiziert. Wie auch in anderen Pilze gibt es keine Chitinasen der Familie 19 (Henrissat & Bairoch, 1993). Resultierend aus der phylogenetischen Analyse gehören die drei identifizierten Endochitinasen in verschiedene Zweige, was ein Hinweis auf nicht-redundante Funktionen ist. Die endochitinolytischen Aktivitätsmessungen von Wildtyp- und *cts1Δ*-Stämmen zeigten, dass extrazelluläre Cts1 die bedeutenste Endochitinase darstellt und dass deren

Enzymaktivität in Assoziation mit der Zellwand von knospenden Sporidien und Filamenten steht. Des Weiteren steigerte sich die Enzymaktivität von Cts1 nach der Induktion des filamentösen Wachstums. Diese Beobachtung ist konsistent mit *Microarray*-Daten, welche eine Induktion der Transkription von *cts1* während der biotrophen Entwicklung detektierten (M. Vranes und J. Kämper, persönliche Mitteilung). Die phänotypische Analyse der *cts1Δ*-Stämme ergab, dass der Verlust der extrazellulären endochitinolytischen Aktivität weder die Filamentbildung noch die Infektionsrate von Maiskeimlingen beeinflusste. Dementsprechend scheint Cts1 für die Regulation der Morphologie und für die Pathogenität des Pilzes entbehrlich zu sein. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass die Endochitinase unter härteren Umweltbedingungen oder während der Sporenentwicklung eine spezifische Funktion ausübt. In *A. nidulans* lokalisiert die Chitinase ChiA spezifisch an Auskeimungsstellen, vor und nach der Keimung der Konidien, an Hyphen-Verzweigungsstellen und auch an Hyphen-Spitzen. Diese subzelluläre Lokalisation hängt von einer Serin/Threonin-reichen Region und vom C-terminalen GPI-Anker-Motiv ab (Yamazaki *et al.*, 2008). Die Endochitinase Cts1 aus *U. maydis* besitzt jedoch kein GPI-Anker-Motiv oder eine charakteristische Chitin-bindende Domäne.

Die differentielle 2D-DIGE-Analyse detektierte drei modifizierte Protein-Varianten der Endochitinase Cts1. Bei den Protein-Varianten handelt es sich möglicherweise um posttranslationale Modifikationen von Cts1, da diese unterschiedliche isoelektrische Punkte im 2D-Gel aufwiesen. Die fraktionierte Western-Analyse detektierte jedoch eine eindeutige Änderung im Molekulargewicht. Interessanterweise wurden verkürzte Protein-Varianten von Cts1 in der Western-Analyse nur nach Induktion der Filamentbildung detektiert, wie es sich in der Membran-assoziierten Proteinfraction von *rrm4Δ*-Filamenten besonders deutlich erkennen lies (Abb. 7A und B). Da die beiden Protein-Varianten Nr. 4 und 6 keine Peptide des N-Terminus von Cts1 aufwiesen ist eine proteolytische Abspaltung nicht auszuschließen. Dazu sei anzumerken, dass die sekretierte Chitinase Cts1 kein Eukaryonten-spezifisches Signalpeptid aufweist und wahrscheinlich über einen nicht-konventionellen Proteinexport sekretiert wird (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>, Emanuelsson *et al.*, 2007). Interessanterweise ist die Chitinase Cts1 anhand eines GUS (β -Glucuronidase)-Reportersystems als ein nicht-konventionell sekretiertes Enzym bestätigt worden (S. Kreibitz, Diplomarbeit 2009). Dennoch ist nicht auszuschließen, dass diese proteolytische Abspaltung eine Export-Funktion einnimmt, da in Wildtyp-Filamenten mehr extrazelluläre endochitinolytische Enzymaktivität gemessen wurde und die analysierten Protein-Fractionen wenig verkürzte Protein-Variante aufwies. Demnach resultiert der

Verlust von Rrm4 in der Anreicherung einer verkürzten Protein-Variante, dabei scheint nur deren Export beeinträchtigt zu sein, nicht die Aktivität. Eine Western-Analyse von extrazellulärem Cts1 könnte diese Hypothese bestätigen. Dies scheiterte bislang aber an der sofortigen Abspaltung des fusionierten Gfps. Die Identifizierung der Unterschiede dieser Membran-assoziierten Protein-Varianten würde dementsprechend zum Verständnis des Exportprozesses von Cts1 beitragen.

Demnach gibt es einen Zusammenhang zwischen Rrm4 und nicht-konventionellem Export von Proteinen. Das RNA-bindende Protein Rrm4 ist am Mikrotubuli-abhängigen Transport bestimmter mRNAs beteiligt (König *et al.*, 2009; Zarnack & Feldbrügge, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde dem Mikrotubuli-abhängigen Transportprozess eine neue Funktion in nicht-konventionellem Proteinexport eines Zellwand-abbauenden Enzyms zugeordnet. In der Abwesenheit von Rrm4 wies der Export der Endochitinase Cts1 eine drastische Verringerung auf. Der eigentliche Transport, die apikale Lokalisation und die Aktivität sind dabei nicht beeinträchtigt. Diese Beobachtungen deuten auf eine Störung in der Sekretion von Cts1 in *rrm4Δ*-Filamenten hin. Eine mögliche Erklärung könnte auf das Fehlen von assoziierten Exportfaktoren zurückzuführen sein oder Proteine des Cts1-Sekretionsapparats unterliegen dem Rrm4-abhängigen mRNA-Transport. Die in dieser Arbeit durchgeführte FISH-Analyse identifizierte die *cts1*-mRNA als direkte Ziel-mRNA des Rrm4-Transportes, da diese bevorzugt in Rrm4-abhängigen Partikeln akkumuliert. Vorherige Studien zeigten, dass im Allgemeinen jede mRNA von Rrm4 entlang des Mikrotubulizytoskeletts transportiert werden kann. Die Ziel-mRNAs von Rrm4 werden jedoch bevorzugt transportiert und die Anwesenheit eines *cis*-aktiven Elements in der mRNA steigert die Frequenz und die Länge des mRNP-Transports (König *et al.*, 2009; Zarnack & Feldbrügge, 2010). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit RNA-Live-Aufnahmen von analysierten tierischen Zellen und Fliegen-Embryonen. In diesen Studien wurde gezeigt, dass die lokalisierenden Transkripte häufiger und mit einer höheren Prozessivität entlang des Mikrotubulizytoskeletts transportiert werden als nicht-lokalisierende Transkripte (Fusco *et al.*, 2003; Bullock *et al.*, 2006).

Folglich liegt die Vermutung nahe, dass eine posttranskriptionale Regulation der Cts1-Sekretion auf der Ebene des mRNA-Langstreckentransports stattfindet. Diese Hypothese wird sowohl durch das Ergebnis der Benomyl-Inhibition als auch durch den Verlust des konventionellen Kin1 unterstützt. In beiden Fällen lässt sich derselbe Effekt wie durch den Verlust von Rrm4 beobachten. Die lokale Translation der *cts1*-mRNA scheint notwendig zu sein, um das endochitinolytische Enzym für die Sekretion kompetent zu

machen. Dabei ist es möglich dass der gleichzeitige Transport von mRNAs und deren lokale Translation für die Bildung eines Sekretions-fähigen Komplexes wichtig sind, welcher die Cts1 und assoziierte Export-Faktoren beinhaltet (Moore, 2005; Du *et al.*, 2007). Analysen aus *S. cerevisiae* zeigten, dass der Aktin-abhängige mRNA-Transport vermittelt durch das RNA-bindende Protein She2p beteiligt ist an der Lokalisation von Membranproteinen, Polaritäts- und Sekretions-Faktoren (Shepard *et al.*, 2003; Aronov *et al.*, 2007). Zum Beispiel wies die polare Lokalisation der *SEC3*-mRNA in der Tochterzelle, kodierend für eine Untereinheit des Exocysten, eine She2p-Abhängigkeit auf (Aronov *et al.*, 2007). Die Analyse des She3-abhängigen mRNA-Transportsystems in dem Human-pathogenen Pilz *C. albicans* deckten eine Beteiligung an der Hyphenmorphologie und dem invasive Wachstum auf. Dabei wurden insgesamt 40 Transkripte identifiziert. Interessanterweise befand sich darunter die *cht2*-mRNA kodierend für eine Chitinase. Eine FISH-Analyse bestätigte die She3-abhängige Lokalisation der *cht2*-mRNA an der Knospungsstelle (Elson *et al.*, 2009). Dementsprechend scheint es auch in *C. albicans* einen Zusammenhang von aktivem mRNA-Transport mit lokaler Translation von Zellwand-abbauenden Enzymen zu geben. In diesem Fall besitzt die Chitinase Cht2 allerdings ein vorhergesagtes Signalpeptid. Eine mögliche Erklärung hierfür scheint ein Myosin-vermittelter Ko-Transport von kortikalem Endoplasmatischen Retikulum zu sein (Schmid *et al.*, 2006). Derzeit gibt es jedoch keine detaillierte Aufklärung der Verbindung zwischen mRNA-Transport und Protein-Sekretion.

Die Analyse der endochitinolytischen Enzymaktivität in Wildtyp- und *rrm4Δ*-Filamenten deckte einen Defekt im Export der Endochitinase Cts1 in Abwesenheit des Rrm4-abhängigen mRNA-Transports auf. Zusätzlich gibt es eine direkte Verbindung zwischen dem *cts1*-Transkript und dem Rrm4-Langstreckentransport. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal eine Abhängigkeit von nicht-konventionellem Protein-Export und Mikrotubuli-abhängigem mRNA-Transport aufgedeckt.

3.2 Rrm4 und die Biogenese von Mitochondrien

Die Aktivität der m-AAA-Protease ist ein wichtiger Bestandteil der Biogenese von Mitochondrien, welche durch zwei unabhängige Genome, das Mitochondrien- und Nukleus-Genom, reguliert wird. Um mögliche Ungleichgewichte zwischen Nukleus- und Mitochondrien-kodierten Polypeptiden zu überwinden haben Mitochondrien ein effizientes Qualitäts-Kontrollsystem für neu importierte Mitochondrien-Proteine entwickelt (Voos & Rottgers, 2002; Tatsuta & Langer, 2008). Die m-AAA-Protease ist eine Hauptkomponente des Qualitäts-Kontrollsystems und kontrolliert die Abläufe von Proteinfaltungen in der inneren Mitochondrienmembran, wobei die funktionale Protease-Domäne in der Matrix lokalisiert. Bei diesem Kontrollmechanismus werden nicht-assemblierte oder geschädigte Proteine selektiv degradiert. In *S. cerevisiae* wurde die mitochondrielle m-AAA-Protease als erstes identifiziert und untersucht. Hier besteht die m-AAA-Protease aus einem hetero-oligomeren Komplex der Untereinheiten Yta10p (Afg3p) und Yta12p (Rca1p). Wenn eine der beiden m-AAA-Protease-Untereinheiten fehlt, weisen die Hefe-Zellen einen respiratorischen Defekt auf und wachsen nicht mehr auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen (Arlt *et al.*, 1996). Des Weiteren sind die Transmembran-Domänen der beiden Untereinheiten für die Assemblierung und proteolytische Aktivität entbehrlich, aber essentiell für den Abbau von integralen Membranproteinen (Korbel *et al.*, 2004). Die humane m-AAA-Protease besteht aus den Untereinheiten Paraplegin und AFG3L2. Im Kontrast zu Hefe besitzen Mitochondrien aus humanen Zellen zwei m-AAA-Isoenzyme, einen hetero-oligomeren Komplex bestehend aus Paraplegin und AFG3L2 und einen homo-oligomeren Komplex bestehend aus AFG3L2 alleine (Koppen *et al.*, 2007). Zu den bekannten Substrat-Polypeptiden der m-AAA-Protease aus Hefe gehören die Komponenten der Atmungskette und die Untereinheiten der F₁F₀-ATPase (Arlt *et al.*, 1996; Arlt *et al.*, 1998), während die physiologischen Substrate der humanen m-AAA-Protease noch weitestgehend unbekannt sind.

Basierend auf den Ergebnissen der differentiellen Proteom-Analyse resultierte der Verlust des RNA-bindenden Proteins Rrm4 in Filamenten in einer reziproken Änderung der drei identifizierten mitochondriellen Proteine. Die m-AAA-Protease Afg3 wurde mit einer 4,5-fachen Erhöhung in induzierten Filamenten des *rrm4Δ*-Stammes identifiziert, wohingegen für die Untereinheiten der Atmungskette Atp4 (Komplex V) und Nuo2 (Komplex I) eine Reduktion der relativen Proteinmenge festgestellt wurde. Der Verlust des mRNA-Transportes in Filamenten führte dementsprechend zu einem Ungleichgewicht in der Assemblierung der Atmungsketten-Komplexe, worauf die Qualitätskontrolle in der

inneren Mitochondrienmembran mit einem gesteigerten Protein-Abbau durch die m-AAA-Protease Afg3 reagiert. Für diese Hypothese sprechen einerseits die verringerten Proteinmengen von Nuo2 und Atp4 in *rrm4Δ*-Filamenten und andererseits die gesteigerte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) in Mitochondrien in Abwesenheit von Rrm4.

Die Produktion von ROS ist ein wichtiger Bestandteil der Redox-Signaltransduktion ausgehend von den Mitochondrien zum Rest der Zelle (Droge, 2002). Des Weiteren ist bekannt, dass humane Erkrankungen, der Alterungsprozess und eine Dysfunktion der Mitochondrien zu einer gesteigerten ROS-Produktion führen (Balaban *et al.*, 2005). Der größte Anteil an in Mitochondrien produziertem ROS ist das Superoxid, welches in der Matrix zum größten Teil durch den Komplex I produziert wird (Murphy, 2009; Hirst, 2010). Der Mechanismus der Superoxid-Produktion durch isolierten Komplex I ist einigermaßen gut verstanden. Superoxid entsteht aus der Reaktion von Sauerstoff mit vollständig reduziertem Flavinmononukleotid (FMN), wobei die Menge an vollständig reduziertem FMN von der NADH/NAD⁺-Ratio bestimmt wird (Kusssmaul & Hirst, 2006; Hirst *et al.*, 2008). Anhand von isolierten Mitochondrien sind korrekte Messungen von Superoxid sehr schwierig, da die physiologischen oder pathologischen Bedingungen *in vitro* schwer nachzustellen sind. Die Verwendung von Superoxid-sensitiven Indikatoren, wie z. B. Hydroethidin und *MitoSOX*TM *RED* lieferten neue Informationen über die mitochondrielle Superoxid-Produktion *in vivo* (Zhao *et al.*, 2005; Robinson *et al.*, 2006; Zielonka *et al.*, 2008a; Zielonka *et al.*, 2008b). Unter physiologischen Bedingungen liegt eine niedrige Superoxid-Produktion in Mitochondrien vor, d. h. die Mitochondrien produzieren aktiv ATP und es liegt eine geringe protonenmotorische Kraft (Δp) vor (Murphy, 2009). Anhand von isolierten Mitochondrien wurden zwei Bedingungen identifiziert, unter denen es zu erhöhter Komplex I-abhängiger Superoxid-Produktion kommt. Erstens, wenn die NADH/NAD⁺-Ratio erhöht ist, z. B. bei Defekten in der Atmungskette, bei Verlust von Cytochrom C während der Apoptose oder bei geringem ATP-Bedarf (Kudin *et al.*, 2004; Kusssmaul & Hirst, 2006). Zweitens, wenn keine ATP-Produktion stattfindet und eine erhöhte Δp und eine gesteigerte CoQH₂/CoQ-Ratio vorliegt (Hansford *et al.*, 1997; Korshunov *et al.*, 1997; Lambert & Brand, 2004). Zusätzlich wurde anhand von isoliertem Komplex I gezeigt, dass durch den Inhibitor Rotenon die Superoxid-Produktion gesteigert wird (Cadenas *et al.*, 1977). Rotenon bindet an die Q-Bindestelle des Komplex I, wodurch es zu einem Rückstau und deshalb zu einer Rückführung der Elektronen vom FMN auf molekularen Sauerstoff kommt (Votyakova & Reynolds, 2001).

Demzufolge liegt in *rrm4Δ*-Filamenten wahrscheinlich ein Defekt in der Assemblierung der Komplexe der Atmungskette vor, wodurch Bedingungen entstehen die zu einer gesteigerten Produktion von Superoxid führen. Eine durch den Inhibitor Rotenon induzierte Superoxid-Produktion wurde in Kulturen knospender Sporidien mit Hilfe des Superoxid-Indikators *MitoSOX*TM *RED* sowohl in den Wildtyp-Stämmen als auch in den *rrm4Δ*-Stämmen beobachtet (Abb. 17A). In Rotenon-behandelten Wildtyp-Filamenten findet ebenfalls eine gesteigerte Superoxid-Produktion statt. Dagegen resultierte die Behandlung mit Rotenon in *rrm4Δ*-Filamenten in einer Reduktion der Superoxid-Produktion (Abb. 17B).

Damit in Übereinstimmung gibt es mit Reversem Elektronen-Transport (RET) einen weiteren Mechanismus, in dem Komplex I vermehrt Superoxid produziert (Adam-Vizi & Chinopoulos, 2006; Kudin *et al.*, 2004; Votyakova & Reynolds, 2001). RET findet in Mitochondrien unter der oben beschriebenen Bedingung bei fehlender ATP-Produktion statt, wenn durch eine erhöhte Δp die Elektronen von CoQH_2 zurück zum Komplex I getrieben werden, wodurch NAD^+ zu NADH am FMN reduziert wird (Cino & Del Maestro, 1989). Die Superoxid-Produktion durch RET wird durch eine Behandlung mit Rotenon aufgehoben, was den Eintritt der Elektronen über die CoQ-Bindestelle bestätigt (Lambert & Brand, 2004).

Diese Beobachtung trifft auf die mit Rotenon behandelten *rrm4Δ*-Filamente zu, da unter diesen Bedingungen eine Verringerung der Superoxid-Produktion detektiert wurde. Dementsprechend liegt in *rrm4Δ*-Filamenten vermutlich eine erhöhte Δp vor und es findet nur eine geringe ATP-Produktion statt. Zusammenfassend führte der Verlust von Rrm4 in Filamenten zur gesteigerten Komplex I-abhängigen Superoxid-Produktion, welche wahrscheinlich auf den RET-Mechanismus zurückzuführen ist. Die gesteigerte Proteinmenge der m-AAA-Protease Afg3 in *rrm4Δ*-Filamenten ist demnach eine Reaktion auf Defekte in der Assemblierung der Atmungsketten-Komplexe, was sich in den verringerten Proteinmengen der identifizierten Untereinheiten Atp4 und Nuo2 widerspiegelt. Davon müsste vorallem der Komplex V betroffen sein, da der reverse Transport von Elektronen bei geringer ATP-Produktion stattfindet. Der Rrm4-abhängige mRNA-Transport scheint eine Rolle beim Import von bestimmten Proteinprodukten in die Mitochondrien zu spielen und ist dementsprechend wichtig für den Morphologiewechsel zwischen Sporidie und Filament.

Auch in anderen Organismen sind Differenzierungsprozesse mit der Mitochondrien-Aktivität verknüpft. In Neuronen ist die Entwicklung von dendritischen Dornfortsätzen von der lokalen Aktivität der Mitochondrien abhängig (Li *et al.*, 2004). Die meisten Mitochondrien-Proteine werden im Nukleus kodiert und müssen in das Organell transportiert werden. Die langjährige Frage, ob mitochondrielle Proteine post-translational oder ko-translational importiert werden, wurde für verschiedene analysierte Proteine sehr unterschiedlich beantwortet (Neupert, 1997; Neupert & Herrmann, 2007; MacKenzie & Payne, 2007). Viele Anhaltspunkte weisen auf einen co-translationalen Import hin. In *S. cerevisiae* stehen die Polysomen mit der äußeren Mitochondrienmembran in Verbindung, an denen verschiedene Proteine translatiert werden (George *et al.*, 2002). Studien mit isolierten Mitochondrien deckten eine Verbindung mit verschiedensten mRNAs, kodierend für mitochondrielle Proteine, auf (Marc *et al.*, 2002; Sylvestre *et al.*, 2003). Bei der Lokalisation einiger mRNAs an Mitochondrien wurde gezeigt, dass Elemente in der kodierenden Region, vorallem innerhalb des mitochondriellen Lokalisierungssignals (MTS, *mitochondrial targeting signal*), und in der 3'UTR für deren Lokalisation wichtig sind (Corral-Debrinski *et al.*, 2000; Margeot *et al.*, 2002). Andere Studien zeigten anhand der asymmetrischen Lokalisation der *atp2*-mRNA, dass ein Zusammenspiel des mitochondriellen Lokalisationssignals mit zwei Elementen, R1 und R2, im offenen Leserahmen nötig ist, um die perimitochondrielle mRNA-Lokalisation aufrechtzuerhalten (Garcia *et al.*, 2010). Des Weiteren ergab eine Lokalisations-Analyse der im Nukleus kodierten Mitochondrien-Proteine eine Aufspaltung in zwei Gruppen, entsprechend ihrer Translation an freien zytoplasmatischen oder an Mitochondrien-assoziierten Polysomen, wobei die mRNAs der letzten Gruppe als mitochondriell lokalisierte mRNAs (MLRs) bezeichnet wurden (Marc *et al.*, 2002). Diese MLRs besitzen im Allgemeinen einen prokaryontischen Ursprung, kodieren für Proteine, welche am initialen Aufbauprozess der Atmungsketten-Komplexe beteiligt sind und werden über TOM-TIM23 importiert (Garcia *et al.*, 2007). Die assymetrische Lokalisation von mRNAs kodierend für mitochondrielle Proteine stellt ein aktuelles Forschungsgebiet dar. Dabei ist das RNA-bindende Protein Puf3 der erste identifizierte *in trans*-wirkende Faktor dieser assymetrischen Lokalisation (Saint-Georges *et al.*, 2008). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Deletion von *tom20*, kodierend für eine periphere Untereinheit des TOM-Komplexes, die Puf3 Lokalisation beeinflusst. Eine direkte Interaktion von Tom20 und Puf3 konnte jedoch nicht gezeigt werden (Eliyahu *et al.*, 2010).

In *S. cerevisiae* wurde eine Klassifizierung der 786 im Nukleus kodierten mitochondriellen Gene in drei Klassen durchgeführt: Klasse I-mRNAs (256 Gene) sind charakterisiert durch Puf3p-abhängige Translation an Mitochondrien-assoziierten Polysomen, Klasse II-mRNAs (224 Gene) werden Puf3-unabhängig an Mitochondrien translatiert und Klasse III-mRNAs (306) werden an zytoplasmatischen Polysomen translatiert (Saint-Georges *et al.*, 2008). Des Weiteren wurden, anhand einer quantitativen Microarray-Analyse von mRNAs, ko-aufgereinigt mit der Mitochondrienfraktion, Mitochondrien-Lokalisationsraten berechnet. Eine Lokalisationsrate von 8% wurde dabei als signifikanter Grenzwert berechnet, um MLRs von nicht-MLR-mRNAs zu differenzieren (Saint-Georges *et al.*, 2008). Die *atp4*-mRNA beinhaltet keine Puf3-Bindestelle in der 3'UTR und würde dementsprechend Puf3-unabhängig mit einer Lokalisationsrate von 32% an Mitochondrien-assoziierten Polysomen translatiert werden. Die *afg3*-mRNA beinhaltet eine Puf3-Bindestelle, wurde in die Klasse I eingeordnet und weist eine Lokalisationsrate von 100% auf. (Saint-Georges *et al.*, 2008). Die mRNAs der Klassen I und Klasse II kodieren zusätzlich für funktional verschiedene Proteine. Die mRNAs der Klasse I kodieren für Assemblierungs-Faktoren der Komplexe der Atmungskette und für die Translations-Maschinerie der Mitochondrien (Ribosomen und Translationsregulatoren). Die Klasse II-mRNAs dagegen kodieren für Proteine der Atmungsketten-Komplexe selbst und für Proteine verschiedenster Stoffwechselwege (Saint-Georges *et al.*, 2008).

Basierend auf der Identifizierung des mitochondriellen Phänotyps in *rrm4Δ*-Filamenten liegt eine Verbindung zwischen Rrm4-abhängigem mRNA-Langstreckentransport mit der Biogenese von Mitochondrien in *U. maydis* nahe. Der Rrm4-abhängige Transport dieser mitochondriellen Transkripte im Filament scheint daran beteiligt zu sein, dass durch die lokale Translation der Import der kodierten Proteine auch in die apikal gelegenen Mitochondrien garantiert wird. Die fehlende Lokalisation der Transkripte kodierend für Atp4, Nuo2 und Afg3 in *rrm4Δ*-Filamenten resultiert demnach in Defekten bei der Assemblierung der Atmungsketten-Komplexe. Nach der in Hefe durchgeführten Klassifizierung wurden die orthologen Gene *atp4* und *afg3* aus Hefe in die Klassen II und I eingruppiert. Da Hefe über keinen Komplex I verfügt, fehlt ein *nuo2*-Ortholog. Demnach handelt es sich bei *atp4*- und *afg3*-mRNA um Mitochondrien-lokalisierte Transkripte. Dieses Hypothese wird bestärkt durch die in Hefe identifizierten hohen Lokalisationsraten der orthologen Gene kodierend für *afg3*- und *atp4*-mRNA. Eine mögliche Beteiligung von Puf3 an diesem Lokalisationsprozess in *U. maydis* müsste überprüft werden. Anhand von Deletionsstudien für *pum1*, das nächste Homolog zu *puf3*,

wurde kein Phänotyp detektiert. Allerdings basieren diese Daten auf einer partiellen Deletion von *pum1*. (Becht *et al.*, 2005). Interessanterweise identifizierte die CLIP-Methode von Rrm4 *in vivo* eine weitere Komplex I-Untereinheit, als *nuo1* bezeichnet (um11731; *related to nadh-ubiquinone oxidoreductase 9.5 kDa subunit*). Zusätzlich wurden noch andere mRNAs kodierend für mitochondrielle Proteine nachgewiesen (J. König, Doktorarbeit 2008; König *et al.*, 2009). Dementsprechend erzielten die bisherigen Untersuchungen eine Funktion des Rrm4-abhängigen mRNA-Transports an der Biogenese von Mitochondrien in Filamenten.

3.3 Das ribosomalen Proteins Rps19 mit extra-ribosomalem Potential

Das ribosomale Protein Rps19 gehört zur 40S Untereinheit des Ribosoms und bindet dort wahrscheinlich an die 18S rRNA (Lutsch *et al.*, 1990). Es gehört zu den ribosomalen Proteinen, welche in Eukaryonten und Archaeen vertreten sind. Das humane Gen *rps19* wurde in Assoziation mit der Diamond-Blackfan-Anämie (DBA), einer seltenen Knochenmarkserkrankung identifiziert. Die DBA ist eine angeborene Form einer schweren chronischen Blutarmut, welche auf einem noch nicht genau geklärten angeborenen Defekt der Erythropoese im Knochenmark beruht. Bei ca. 25% der DBA-Patienten konnten heterozygote Mutationen in *rps19* diagnostiziert werden (Draptchinskaia *et al.*, 1999; Gregory *et al.*, 2007). Die Assoziation eines ribosomalen Proteins mit einer humanen Erkrankung legte offen, dass ribosomale Proteine in der Zelle komplexere Funktionen übernehmen können als ursprünglich angenommen. Daraufhin wurden weitere ribosomale Proteine mit einer Verbindung zu DBA identifiziert, und zusätzliche Mutationen in verschiedensten ribosomalen Proteinen eine Beteiligung an anderen Entwicklungsdefekten und erhöhten Krebsrisiken aufgedeckt werden (Gazda *et al.*, 2008). Für Rps19 wird eine extra-ribosomale Funktion angenommen, was durch eine Interaktion mit dem humanen Wachstumsfaktor FGF-2 (*fibroblast growth factor 2*) *in vitro* bestärkt wurde (Soulet *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte in Fibroblasten gezeigt werden, dass Rps19-Dimere involviert sind in die Metall-induzierte Apoptose (Nishiura *et al.*, 2005).

Auch in *S. cerevisiae* wurden extra-ribosomale Funktionen für eine Reihe von Proteinen beschrieben. Nach einer frühen Genomduplikation sind hier ca. 10% aller Gene dupliziert, welche im Verlauf der Evolution, möglicherweise wegen spezialisierter Funktionen, nicht verloren gegangen sind (Kellis *et al.*, 2004). Bemerkenswerterweise wurden 59 von 78 Genen kodierend für ribosomale Proteine als verdoppelte genomische Kopien beibehalten (Komili *et al.*, 2007). Es wurde gezeigt, dass es funktionelle

Spezifitäten der paralogen ribosomalen Proteine während der Sporulation, der Aktin-Zytoskelett-Organisation und in der Wahl der Knospungsseite gibt (Ni & Snyder, 2001; Enyenihi & Saunders, 2003; Haarer *et al.*, 2007). Andere Studien identifizierten einige duplizierte ribosomale Gene, welche für die Lokalisation der *ASH1*-mRNA benötigt werden. Dabei besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Genen, die für die *ASH1*-Lokalisation benötigt werden, und solchen, die an der Wahl der Knospungsseite beteiligt sind (Komili *et al.*, 2007). Die Einzel-Deletionen der duplizierten *rps19*-Gene, *rps19a* und *rps19b* haben reduzierte Wachstumsraten zur Folge, wohingegen in Stämmen mit einer Doppel-Deletion die Auskeimung der Sporen ausbleibt (Leger-Silvestre *et al.*, 2005). Außerdem wurde für Rps19 eine Funktion in der Assemblierung und Reifung der prä-40S-ribosomalen Untereinheit, der rRNA-Reifung und der Regulation des Zellzyklus beobachtet (Badhai *et al.*, 2009a; Badhai *et al.*, 2009b; Choesmel *et al.*, 2007; Flygare *et al.*, 2007). Andere Studien entdeckten, dass Rps19 die 5'UTR seines Transkriptes bindet, wodurch eine posttranskriptionelle Regulation vermittelt wird. Darüberhinaus wird angenommen das Rps19 auch verschiedene andere 5'UTRs bindet, um dadurch bestimmte Transkripte zum Ribosom zu rekrutieren und deren Translation zu begünstigen (Angelini *et al.*, 2007; Flygare & Karlsson, 2007; Schuster *et al.*, 2010). Interessanterweise wurde für das humane Rps19 eine Interaktion mit der onkogenen Kinase Pim1 gezeigt, welche in der Lage ist Rps19 *in vitro* zu phosphorylieren (Chiocchetti *et al.*, 2005).

Diese Beispiele begünstigen die Annahme einer extra-ribosomalen Funktion von Rps19 aus *U. maydis*. Das ribosomale Protein Rps19 wurde in der differentiellen Proteom-Analyse mit einer 15-fachen Erhöhung der relativen Proteinmenge in *rrm4Δ*-Filamenten identifiziert. Dieses Protein zeigte demnach den höchsten Expressionsunterschied in der Membran-assoziierten Proteinfraction der analysierten Stämme AB33 und AB33rrm4Δ. Die C-terminale Fusion mit eGfp beeinträchtigte die Funktion von Rps19, was sich in einem extrem verlangsamten, vegetativen Wachstum und in einer aberranten Zellmorphologie des Pilzes widerspiegelte. Die gleichverteilte zytoplasmatische Lokalisation von Rps19G lies auf eine ebenso gleichmäßige Verteilung von Ribosomen in Sporidien und Filamenten schließen, demnach hat es den Anschein, dass die Translation überall im Filament stattfindet. Die Lokalisation von Ribosomen in Filamenten wurde in frühen Studien anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen von *Fusarium acuminatum* visualisiert. Neben der gleichmäßig verteilten zytoplasmatischen Lokalisation beinhaltet auch der Spitzenkörper eine Anhäufung von Ribosomen (Howard, 1981). In den Fluoreszenzaufnahmen von Wildtyp-Filamenten ließen sich deutliche Ansammlungen von Rps19G erkennen, welche in

allen Bereichen des Filamentes bis zur Hyphenspitze hin zu finden waren. Es hatte den Anschein, als ob diese zytoplasmatischen Strukturen in *rrm4Δ*-Filamenten weniger deutlich vertreten waren, wobei eine Quantifizierung wegen der abberanten Morphologie und dem unterschiedlichen Wachstumsverhalten während der Filamentbildung nicht durchgeführt wurde (Abb. 3B). Anhand von ersten Fluoreszenz-mikroskopischen Filmen ließen sich eindeutige Bewegungen dieser partikulären Rps19G-Strukturen in Filamenten von AB33rps19G, insbesondere im Zytoplasma um den Nukleus, beobachtet, welche in *rrm4Δ*-Filamenten nicht zu erkennen waren (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich ist eine Abschwächung des Fluoreszenzsignals zu den Hyphenspitzen hin in bipolaren Filamenten des Stammes AB33rps19G/*rrm4Δ* zu beobachten, wohingegen die Mutterzelle ein verstärktes Signal aufweist (Abb. 3B). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Lokalisation und die Dynamik von Rps19 in *rrm4Δ*-Filamenten beeinträchtigt sind, jedoch ist dies wegen des Funktionsverlusts von Rps19G schwierig zu beurteilen. Eine vorläufige Western-Analyse bestätigte die Erhöhung in der Membran-assoziierten Proteinfraction in *rrm4Δ*-Filamenten (Daten nicht gezeigt). Da jedoch die C-terminale Fusion des ribosomalen Proteins mit eGfp zu auffälligen Wachstumsstörungen führte, müsste dies durch die Herstellung z. B. einer N-terminalen eGfp-Fusion erneut untersucht werden. Die Detektion eines einzigen differentiell exprimierten ribosomalen Proteins in der Membran-assoziierten Proteinfraction könnte ein Hinweis für eine Membran-ständige extra-ribosomale Funktion von Rps19 sein. Eine andere Proteom-Analyse identifizierte zwei phosphorylierte Formen von Rps19 (Böhmer *et al.*, 2007). Es ist demnach nicht auszuschliessen, dass die Phosphorylierung von Rps19 während des filamentösen Wachstums von *U. maydis* eine regulatorische Funktion einnimmt. Des Weiteren besitzt Rps19 aus *U. maydis* einen auffällig sauren C-Terminus bestehend aus 18 Asparaginsäure- und Glutaminsäure-Resten, welcher nicht hoch konserviert zu sein scheint (J. Koepke, Diplomarbeit 2005).

Die Analyse möglicher Ziel-RNAs von Rrm4 mit der *in vivo* CLIP-Technologie identifizierte die mRNAs zahlreicher ribosomaler Proteine. Zum Beispiel wurde die *ubi1*-mRNA gefunden, welche für ein hoch-konserviertes Fusionsprotein aus dem ribosomalen Protein Rpl40 und Ubiquitin kodiert (König *et al.*, 2009). In *S. cerevisiae* kommt es direkt nach der Translation zu einer Abspaltung des Ubiquitins, welches in schnell wachsenden Hefe-Kulturen die Hauptquelle für Ubiquitin darstellt (Catic & Ploegh, 2005; Finley *et al.*, 1989). In *U. maydis* ko-lokalisiert das RNA-bindende Protein Rrm4 und die *ubi1*-mRNA *in vivo* in pendelnden Partikeln. Die eigentliche Funktion des Rrm4-abhängigen Transports dieser ribosomalen mRNA wurde bisher noch nicht aufgeklärt. Die *rps19*-mRNA wurde in

der CLIP-Analyse nicht identifiziert, möglicherweise da die Identifizierung der Ziel-RNAs nicht sättigend erfolgte (J. König, Doktorarbeit 2008). Eine direkte Interaktion der *rps19*-mRNA mit Rrm4 könnte, z. B. anhand einer FISH-Analyse oder mittels der *green-RNA*-Technik erfolgen (König *et al.*, 2009). Für die beiden ribosomalen Proteine Rps19 und Ubi1 kann momentan eine extra-ribosomale Funktionen z. B. während der Transkriptspezifischen Regulation der Translation nur spekuliert werden. Eine solche Funktion konnte für das humane ribosomale Protein L13a identifiziert werden (Mazumder *et al.*, 2003; Ray *et al.*, 2007).

Zusammenfassend lieferten diese initialen Analysen für das ribosomale Protein Rps19 keine direkte Verbindung zum Rrm4-abhängigen Langstreckentransport. Dennoch weisen die erhöhte Expression von Rps19 in der Membran-assoziierten Proteinfraction und die vorläufigen Beobachtungen der veränderten Lokalisations-Strukturen in Kombination mit dem zu der wachsenden Hyphenspitze hin abnehmenden Rps19G-Fluoreszenzsignal in *rrm4Δ*-Filamenten auf extra-ribosomale Funktionen hin und sollten weiterhin verfolgt werden.

3.4 Rrm4 bildet die Haupttransporteinheit für mRNA-Langstreckentransport in Filamenten

Die Komplementationsanalyse in Hefe bestätigte das putative Poly-(A)-bindende Protein aus *U. maydis* eindeutig als solches. Obwohl die Domänenstruktur von Rrm4 einen ähnlichen Aufbau wie Pab1 beinhaltet (Becht *et al.*, 2006) erfolgte für Rrm4 anhand des Komplementationstests in *S. cerevisiae* eine funktionelle Trennung von Pab1. In Wildtyp-Filamenten ließ sich neben den pendelnden Partikelstrukturen eine gleichmäßig verteilte zytoplasmatische Pab1G-Lokalisation beobachten. Die Lokalisationsstudie von Pab1G in *rrm4Δ*-Filamenten resultierte in einer drastischen Abnahme der Partikelbildung, wobei keine pendelnden Partikel detektiert werden konnten. Die zusätzliche Quantifizierung ergab eine Abnahme von 50% der zytoplasmatischen Pab1G-Fluoreszenz zu den Hyphenspitzen hin. Dementsprechend zeigt Rrm4 eine Beteiligung an einer Gleichverteilung der zytoplasmatischen mRNAs im Filament. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass prinzipiell alle mRNAs von Rrm4 transportiert werden können, jedoch direkte Ziel-Transkripte mit einer höheren Frequenz und Prozessivität bevorzugt transportiert werden (König *et al.*, 2009). Solche Hauptkomponenten des aktiven mRNA-Transportes wurden bisher nur in wenigen Fällen beschrieben, z. B. die RNA-bindenden

Proteine She2p aus *S. cerevisiae* und Staufen aus *D. melanogaster* (Martin & Ephrussi, 2009). Stützend auf die Annahme, dass Pab1 an den sogenannten Poly-(A)-Schwanz der meisten reifen mRNAs bindet (Hogan *et al.*, 2008), wurde anhand dieses molekularen Markers der Rrm4-abhängige Langstreckentransport als die Haupttransporteinheit für mRNAs in Filamenten charakterisiert. Die quantifizierten Daten der Ko-Lokalisationsstudie von Rrm4G mit Pab1R besagten, dass nahezu 100% der Rrm4-Partikel in Assoziation mit mRNAs sind. Demnach scheint es keine unbeladenen Rrm4-Partikel zu geben.

Zusammenfassend deuten diese Analysen auf eine generelle Funktion von Rrm4 in der Verteilung zytoplasmatischer mRNAs hin. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit das RNA-bindende Protein Rrm4 als die Haupttransporteinheit des Mikrotubuli-abhängigen mRNA-Transports in Filamenten identifiziert (König *et al.*, 2009).

3.5 Modellvorstellung

Das RNA-bindende Protein Rrm4 erfüllt eine wichtige Funktion während der Ausbildung der Polaritätsachse von Filamenten. Dabei bildet es die Haupttransporteinheit des bidirektionalen aktiven mRNA-Langstreckentransportes entlang des Mikrotubuli-Zytoskeletts. Die pendelnden Rrm4-abhängigen Partikel scheinen dabei in stetigem Kontakt mit mRNAs zu stehen. Dabei werden bestimmte Ziel-mRNAs bevorzugt transportiert, obgleich alle Transkripte von Rrm4 transportiert werden können. Der daraus resultierende Effekt ist einerseits die gleichmäßige zytoplasmatische Verteilung der meisten mit Pab1-assoziierten mRNAs im gesamten Filament (Abb. 21A) und andererseits die gesteigerte subzelluläre Lokalisation einer bestimmten Population von Transkripten. Die Regulation der Prozessivität und Frequenz des Transportes wird dabei durch *cis*-aktive Elemente gesteuert, wobei möglicherweise noch additive Kofaktoren in den Mechanismus involviert sind. Durch die Gewährleistung der gleichmäßigen Verteilung der mRNAs werden auch die vom Nukleus entfernten Zytoplasmabereiche, Kompartimente und Organelle mit den entsprechenden Proteinprodukten versorgt. Der Mikrotubuli-abhängige Transport in *U. maydis* vermittelt durch Rrm4 scheint dabei symmetrische und asymmetrische Lokalisation von kodierenden Proteinen zu vermitteln. Dieser Mechanismus wurde auch für den She2p-abhängigen Kurzstreckentransport in *S. cerevisiae* vorgeschlagen, welcher an der symmetrischen Verteilung in Mutter- und Tochterzelle des Membranproteins Ist2p beteiligt ist und außerdem die asymmetrische Akkumulation des Transkriptionsfaktors Ash1p im Tochterzellkern steuert (Jansen, 2001; Zarnack & Feldbrügge, 2010). Diese Hypothese

wurde ebenfalls für den Aktin-abhängigen Transport in *C. albicans* postuliert (Elson *et al.*, 2009).

Basierend auf den in dieser Arbeit charakterisierten Defekten von *rrm4Δ*-Filamenten scheint der Rrm4-vermittelte *cts1*-Transport für deren effizienten Proteinexport wichtig zu sein. Durch den Verlust von Rrm4 wurden weder die apikale Lokalisation noch die Aktivität von Cts1 beeinflusst. Dennoch kommt es in *rrm4Δ*-Filamenten zu einer Anreicherung von verkürzten Membran-assoziierten Protein-Varianten der Cts1 und zu einer reduzierten nicht-konventionellen Protein-Sekretion (Abb. 21B). Da der nicht-konventionelle Export von Proteinen Vesikel-abhängige und Vesikel-unabhängige Exportwege beinhaltet (Nickel & Rabouille, 2009; Nickel, 2010) ist nicht auszuschließen, dass der Rrm4-abhängige mRNA-Transport an Vesikeltransport gekoppelt ist. Interessanterweise ist She2p in *S. cerevisiae* zusammen mit assoziierten Faktoren, Myo4p, She3p u. s. w., nicht nur an der Lokalisation von mRNA sondern auch am Transport des kortikalen Endoplasmatischen Retikulums in die Tochterzelle beteiligt (Jansen *et al.*, 1996; Estrada *et al.*, 2003). Hierzu wird ein neues Modell des Kotransportes von mRNPs und dem Endoplasmatischen Retikulum postuliert (Schmid *et al.*, 2006). Dementsprechend vermittelt Rrm4 die lokale Translation von Cts1 an Vesikeln, welche wichtig für die assymetrische, effiziente Sekretion ist. In *rrm4Δ*-Filamenten ist die Verbindung zu den Vesikeln gestört und resultiert in ineffizienter Sekretion, wobei die assymetrische Lokalisation nicht beeinträchtigt ist (Abb. 21B). Es ist nicht auszuschließen, dass der Rrm4-abhängige mRNP-Transport nicht nur die Sekretion der Endochitinase Cts1 vermitteln sondern generell am Aufbau und Erhaltung des Polarisoms und Spitzenkörpers involviert sein, um Polaritätsachse mit distaler Septenbildung und apikalem Hyphenwachstum zu regulieren.

Im Gegensatz dazu scheint die über Rrm4-vermittelte Gleichverteilung von mRNAs kodierend für mitochondrielle Proteine für die Biogenese der Mitochondrien wichtig zu sein. Die mitochondrielle Lokalisation von mRNAs kodierend für Mitochondrienproteine unterliegt demnach der Rrm4-abhängigen symmetrischen Verteilung dieser Transkripte über das Mikrotubuli-Zytoskelett im Filament. Diese symmetrische Verteilung gewährleistet aktive Mitochondrien im gesamten Wildtyp-Filament. Durch den Verlust von Rrm4 werden die subapikal gelegenen Mitochondrien unterversorgt und es kommt zu Defekten in der Biogenese. Die in der Nähe des Nukleus lokalisierten Mitochondrien erfahren im Gegensatz dazu verstärkten Ein- und Umbau, welcher sich in der Erhöhung der Afg3-Protease widerspiegelt (Abb. 21C). Die resultierenden Defekte in der Assemblierung

der Atmungsketten-Komplexe führen dementsprechend zu einer reduzierten ATP- und einer erhöhten Superoxid-Produktion. Dieser lokale Aktivitätsverlust beeinträchtigt dadurch das Spitzenwachstum.

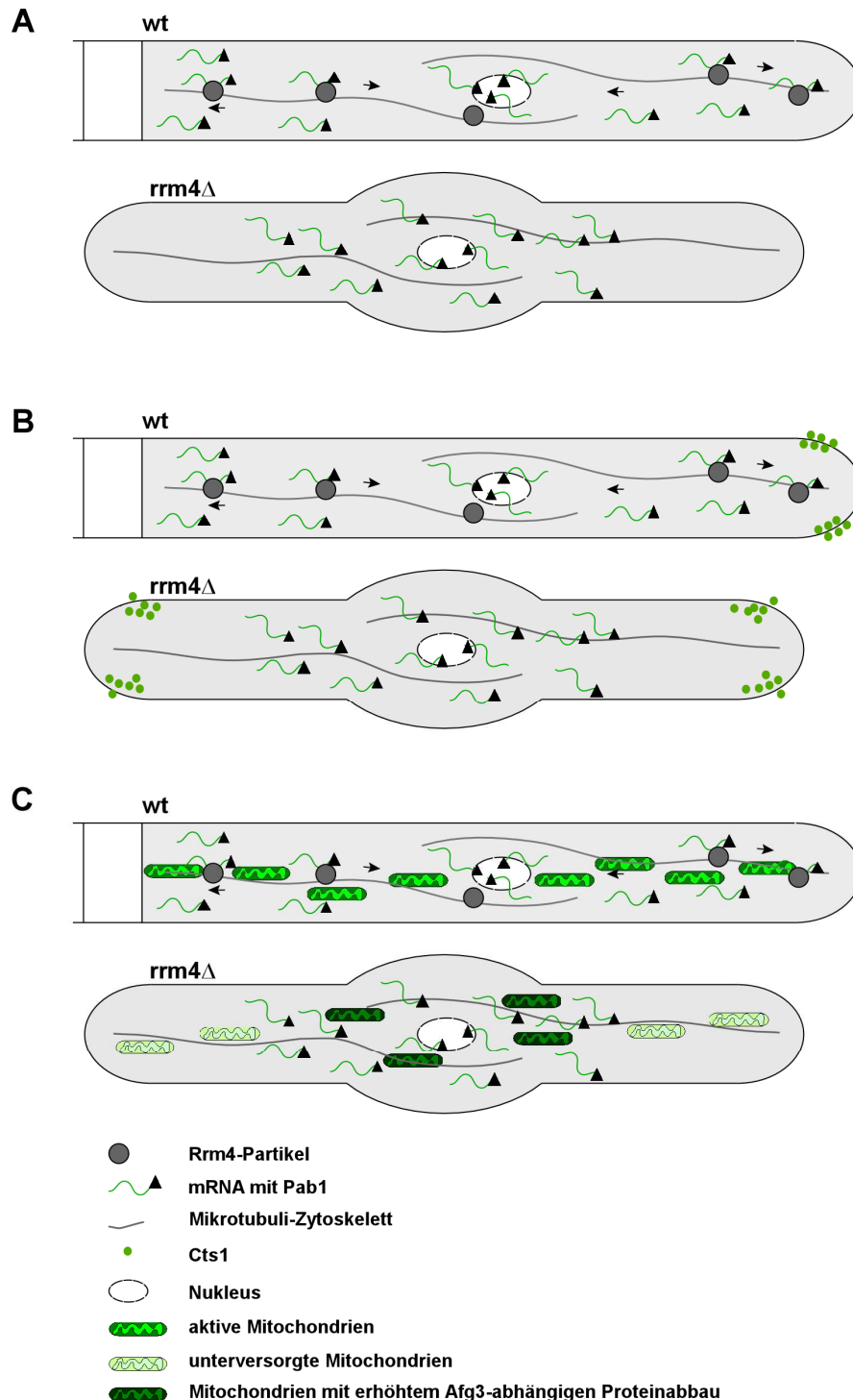


Abbildung 21: Modellvorstellung der Funktion des Rrm4-abhängigen mRNA-Transports. (A) Schematische Darstellung der Verteilung von mRNA mit Pab1 in Wildtyp- (wt) und rrm4 Δ (rrm4 Δ) – Filamenten. (B) Schematische Darstellung der Cts1-Lokalisation in Wildtyp- und rrm4 Δ – Filamenten. (C) Schematische Darstellung der Mitochondrienaktivität in Wildtyp- und rrm4 Δ – Filamenten.

3.6 Ausblick

Die hier erzielten Daten über die Funktion des Rrm4-abhängigen mRNA-Langstreckentransports bieten ein breites Spektrum an neuen Forschungsschwerpunkten an. Die Verknüpfung von mRNA-Transport mit nicht-konventioneller Sekretion bildet einen neuen Aspekt der aktiven Lokalisation und Translation. Die Herstellung von verkürzten *cts1*-Transkripten in Kombination mit FISH-Analysen und endochitinolytischer Aktivitätsmessung stellen Möglichkeiten dar, um das *cis*-aktive Element zu identifizieren. Des Weiteren würde die Identifizierung von weiteren Proteinkomponenten dieses Transportprozesses und deren Verknüpfung mit der involvierten Sekretionsmaschinerie neue Erkenntnisse über den Export von Proteinen ergeben. Mit Hilfe des etablierten GUS- (β -Glucuronidase)-Reportersystems (S. Kreibitz, Diplomarbeit 2009) für Cts1 ließen sich anhand einer Mutations-Analyse die einzelnen Komponenten dieses nicht-konventionellen Sekretionsprozesses identifizieren und dementsprechend neue Erkenntnisse über den Transportprozess liefern. Die Aufklärung der Beteiligung des mRNA-Transportes an der Biogenese von Mitochondrien in Filamenten bietet sowohl biochemische, genetische, als auch zellbiologische Ansatzmöglichkeit. Um eine direkte Verbindung zum Rrm4-abhängigen mRNA-Transport knüpfen zu können, müssten die mRNAs der identifizierten mitochondrialen Proteine anhand einer FISH-Analyse untersucht werden. Zusätzlich könnte eine *Microarray*-Analyse von aufgereinigten Mitochondrien aus Wildtyp- und *rrm4* Δ -Filamenten genutzt werden, um die Annahme einer Beteiligung von Rrm4 an der Mitochondrien-Lokalisation von bestimmter mRNAs zu bestätigen. Die biochemische Untersuchung von Proteinkomponenten und lokaler Aktivität der Mitochondrien-Subpopulationen aus Wildtyp- und *rrm4* Δ -Filamenten würden die Hypothese des lokalen Aktivitätsverlustes bestätigen. Zusätzlich ließen sich anhand von FRAP- (*Fluorescence Recovery after Photobleaching*) Experimenten Daten über die Geschwindigkeit des Protein-Imports gewinnen. Die Erhöhung von Rps19 in *rrm4* Δ -Filamenten müsste anhand einer N-terminalen eGfp-Fusion überprüft werden. Darüberhinaus würden Mutationsanalysen der putativen Phosphorylierungsstellen möglicherweise neue Einblicke über eine extra-ribosomalen Funktion von Rps19 ergeben. Zusätzlich liefert die Pab1-Lokalisation einen molekularen Marker zur Identifizierung und Charakterisierung neuer Komponenten dieses mRNA-Transportes.

4 Material und Methoden

4.1 Materialien und Bezugsquellen

4.1.1 Lösungen, Medien, Enzyme, Kits und Chemikalien

Chemikalien: Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren p.a. Qualität und wurden von den folgenden Firmen bezogen: Ambion, Sigma-Aldrich, Merck, Fluka, Gerbu, Roche, Seakem, Duchefa, Difco, Serva, BioRad, GE Healthcare, Pharmacia, Invitrogen und Carl Roth

Puffer und Lösungen: Standard-Puffer und Lösungen wurden nach Ausubel *et al.* (1987) und (Sambrook *et al.*, 1989) hergestellt. Spezielle Puffer und Lösungen sind unter den jeweiligen Methoden aufgelistet.

Medien: Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT-Flüssigmedium und YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989), welche 5 min bei 121°C autoklaviert wurden. Ampicillin wurde in einer Konzentration von 100 µg/ml eingesetzt (YT-Amp).

Für die Kultivierung von *U. maydis* wurden folgende Medien verwendet, die wenn nicht anders angegeben, 5 min bei 121°C autoklaviert wurden.

CM-Glk Vollmedium

((Banuett & Herskowitz, 1989; Holliday, 1974)
1,5 g NH₄NO₃
2,5 g Casamino Acids
0,5 g DNA
1 g Yeast Extract
autoklaviert.
10 ml Vitamin-Lösung (siehe unten)
62,5 ml Salz-Lösung (siehe unten)
1 ml Spurenelement-Lösung (siehe unten)
20 g Bacto Agar (für Platten)
mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt,
pH-Wert auf 7,0 mit NaOH eingestell und autoklaviert.
nach dem Autoklavieren:
20 ml 50% (w/v) Glukose-Lösung

NM-Glk Medium

(Holliday, 1974)
3 g KNO₃
62,5 ml Salz-Lösung
mit H₂O auf 980 ml aufgefüllt,
pH-Wert auf 7,0 mit KOH eingestellt und
nach dem Autoklavieren:
20 ml 50% (w/v) Glukose-Lösung

YEPS_L-Medium,

modifiziert nach (Tsukuda *et al.*, 1988)
10 g Yeast Extract
10 g Pepton
10 g Saccharose
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt.

NSY-Glycerin (Einfriermedium):

8 g Nutrient Broth
1 g Yeast Extract
5 g Saccharose
800 ml 87% (v/v) Glycerin
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt.

Salz-Lösung

(Holliday, 1974)
16 g KH₂PO₄
4 g Na₂SO₄
8 g KCl
4 g MgSO₄ x 7 H₂O
1,32 g CaCl₂ x 2 H₂O
8 ml Spurenelement-Lösung
mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.

Spurenelement-Lösung

(Holliday, 1974)
60 mg H₃BO₃
140 mg MnCl₂ x 4 H₂O
400 mg ZnCl₂
40 mg NaMoO₄ x 2 H₂O
100 mg FeCl₃ x 6 H₂O
40 mg CuSO₄ x 5 H₂O
Mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.

Vitamin-Lösung

(Holliday, 1974)

100 mg Thiamin
50 mg Riboflavin
50 mg Pyridoxin
200 mg Calciumpantothenat
500 mg p-Aminobenzoesäure
200 mg Nikotinsäure
200 mg Cholinchlorid
1000 mg myo-Inositol

Mit H₂O auf 1 l aufgefüllt und sterilfiltriert.

Regenerationsagar

(Schulz *et al.*, 1990)

(a) Top-Agar:

1,5% (w/v) Bacto-Agar
1 M Sorbitol

in YEPS-Medium (siehe oben)

(b) Bottom-Agar:

wie (a), zusätzlich 400 g/ml Hygromyzin oder
150 g/ml Nourseotricin (ClonNat)

Für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* wurden folgende Medien verwendet, die wenn nicht anders angegeben, 5 min bei 121°C autoklaviert wurden.

SC- (*Synthetic Complete*) und YP-Hefemedien wurden aus einem Dreikomponentensystem erzeugt.

Komponente 1: 200 ml 2x SC- Nährlösung ohne die gewünschten Aminosäuren bzw. 2x YP-Nährlösung.

Komponente 2: 50 ml 20 % Glucose

Komponente 3: 250 ml H₂O für Flüssigmedien oder 10 g Agar in 250 ml H₂O für Festmedien.

2x SC-Nährlösung ohne gewünschte Aminosäuren:

SC-Pulver ohne gewünschte Aminosäuren 5g
Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids 16,75 g

Mit H₂O auf 1 l aufgefüllt, 30 min gerührt, zu je
200 ml abgefüllt und anschließend autoklaviert.

SC-Pulver ohne gewünschten Aminosäuren: SC-Grundmischung	36,7 g
Histidin	2 g
Leucin	4 g
Uracil	2 g
Tryptophan	2 g
Adenin	0,25g

Die Aminosäuren aus der Liste, die nicht anwesend sein sollten, wurden weggelassen. Anschließend wurde über Nacht gemischt.

SC-Grundmischung:

Alanin	20 g	Tyrosin	20 g
Arginin	20 g	Valin	20 g
Asparagin	20 g	p-Aminobenzoe Säure	2 g
Asparaginsäure	20 g		
Cystein	20 g		
Glutamin	20 g		
Glutaminsäure	20 g		
Glycin	20 g		
Inositol	20 g		
Isoleucin	20 g		
Lysin	20 g		
Methionin	20 g		
Phenylalanin	20 g		
Prolin	20 g		
Serin	20 g		
Threonin	20 g		

Die aufgeführten Komponenten wurden über Nacht gemischt.

YP-Komplettmedium

(2x Stammlösung)

50 g Bacto Peptone

25 g Bacto Yeast Extract

mit H₂O auf 1 l aufgefüllt**Verwendete Kits und Enzyme****In dieser Arbeit verwendete Kits**

Plasmid Midi Kit (100) (Qiagen)	zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA
JETsorb® Kit (Qiagen)	zur Eluierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen
TOPO-TA® Cloning Kit (Invitrogen)	zur Klonierung von PCR-Fragmenten
JETquick® General DNA Clean-Up Kit (Genomed)	zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung
ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)	zur Herstellung der Sequenzierungsreaktionen
PCR-DIG-labeling Kit (Roche)	zur Dioxigenin-Markierung von PCR-Produkten
JETquick® Plasmid Miniprep Kit (Genomed)	zur Präparation hochreiner Plasmid-DNA
JETquick® General DNA Clean-Up Kit (Genomed)	zur Aufreinigung von Plasmiden vor der Sequenzierung

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Enzyme

Name	Bezugsquelle
Alkalische Phosphatase	Roche
DNaseI	Roche
Herkulase	Stratagene
Lysozym	Merck
Novozym 234	Novo Nordisc
Phusion	Finnzymes
PNK	New England Biolabs
Quick-Ligase	BioLabs, Inc.
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNase A	Boehringer
RNasin	Invitrogen
Taq DNA-Polymerase	Laborpräparation
T4-DNA Ligase	Roche

4.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH synthetisiert. Die Nukleotidsequenz ist jeweils vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende angegeben.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete DNA-Oligonukleotide:

Bezeichnung	Nukleotidsequenz ^(a)
oMF911	ggtggccgcgttggccTTAGCCTCAGTCTTGGGAGC
oMF912	ataggcctgagtggccTGAGCGGTTTCAGATCATC
oMF914	tgctctcggattcgaggc
oSL12	TTGCTGACTTGTCGTGCG
oSL64	ATCGCAGACGTGCGGATG
oSL66	ttcggccatctaggccAAAGCGAGTGCGAAGGCG
oSL67	tgaggcctgagtggccCTGCGATGCCTTGCGATGC
oSL69	ATGGCACGCTCTGCGTTC
oSL70	AGCACAGGATGTCTCGCG
oSL71	AGGAGAAGTGCTGCTGGG
oSL87	TTGCCAGCCATGCTCAGC
oSL88	ccatggtggccgcgttggccgcCTCGTCATCCTCCTCGTCATCCTCCTCCTCAGACTCG
oSL89	ataggcctgagtggccTCTTGTCGTTACGCCGCC
oSL90	ACAAGTTGGTACGAAGCGTCCATC
oSL123	GTTGCAGCTTGCAGGAAC
oSL144	AACAAGGCGTCTGCTTCGAG
oSL145	ccatggtggccgcgttggccgcCTTGAGGCCGTTCTTGACATTGTCCCACTTGCTG
oSL224	CATTCGCCCTTCGCGAAG
oSL225	ATGGGTGGCAGGTGCATG
oSL226	ATGGTCAGGTCCACAGGG
oSL339	ACGACACACCTCAGAACG
oSL340	GTATCAGAACTGGGCGC
oSL342	TTGTATTGTCTCGGCCCC
oSL345	CAGGTATTTGAGCCTGGC
oSL350	AGGCTGGGCAGAAAGGAG
oSL353	TGGAACGAACCAAGGGCG
oSL358	CTTGCACCAGATCTCCCC
oSL361	AGCTTGTCTCTGCCGAGG
oSL373	gttggcgccgcctGCATCAGACTCGACGTC
oSL376	gttggcgccgcGATACGCTGAATGCTTCGC
oSL377	ttcggccatctaggccGCATCGATGCGCGGTATC
oSL378	tgaggcctgagtggccGATACGCTGAATGCTTCGC
oSL387	(T) TGTAGTTGCCG (T) CGTCCTTGAAGAAGA (T) GGTGCGCTCC (T)
oSL388	(T) AGACGTTGTGGC (T) GTTGTAGTTGTAC (T) CCAGCTTGTGC (C)
oSL389	(G) TGGCGGATCT (T) GAAGTTCACCTTGA (T) GCCGTTCTTCTG (C)
oSL390	(T) CACGAACTC (C) AGCAGGACCATG (T) GATCGCGCTTCTCGT (T)
oSL407	GTTGGCGCGCCAGCCTTGGACTTGACCAG
oSL408	GTTGGCGCGCCGAGGAATTGCCGAAGCC
oSL409	TTCGGCCATCTAGGCCGCACATGTTGCTCCAC
oSL410	tgaggcctgagtggccGCAGGAATTGCCGAAGCC
oSL411	GTTGGCGCGCCTTGGTCTGCTGTTGAGCGC

oSL412	tgaggcctgagtggccAGCTGCTAGCGTCCAACG
oSL413	ttcggccatctaggccCGTCGGCTCAGCAGTCAA
oSL414	GTTGGCGCGCCAGCTGCTAGCGTCCAACG
oSL489	TCACCCATCCTCCCTTGG
oSL490	ACCGTATGGTCATCGGCG
oSL493	GACTTGCTACCAAGGCGC
oSL494	AGCTCCACCAGTTGCACC
oSL495	TCGCTGAGATCGAGAGCC
oSL496	CCGTCGAGCAACAGACAG
oSL518	TGCCTGTGTCGGGTATGG
oSL519	GCCCTCACCACAACCTTC
oSL521	GCTTGTGCCGTGTATCGC

Cy3-markierte Nukleotide in Klammern

4.1.3 Plasmide und Plasmidkonstruktionen

Ausgangsplasmide und Klonierungsvektoren:

pCR2.1[®]-TOPO (Invitrogen)

Vektor zum Klonieren von PCR-Produkten mittels Topoisomerase-Aktivität. Blau/Weiß-Selektion auf Anwesenheit eines insertierten Fragments ist möglich.

pBS-hhn (pUMa194; Kämper, 2004)

Der Vektor enthält eine 1,8 kbp große *SfiI-SfiI*-Kassette die ein Hygromylin-Resistenzgen, bestehend aus hsp70-Promotor, *hph*-Gen und Terminator T_{nos} enthält. Kassette wird für die Herstellung von Deletionsmutanten verwendet.

pMF5-1h (pUMa389; Becht *et al.*, 2006)

Der Vektor enthält eine 2,45 kbp große *SfiI-SfiI*-Kassette zur Herstellung von C-terminalen eGfp-Fusionen. Des Weiteren beinhaltet es den Terminator T_{nos} und ein Hygromylin-Resistenzgen.

pMF1-n (pUMa262; Brachmann *et al.*, 2004)

Der Vektor enthält eine 1,44 kbp große *SfiI-SfiI*-Kassette mit Nourseothrizin-Resistenz, die vorwiegend für die Herstellung von Deletionsmutanten verwendet wird.

pMF5-2h (pUMa890; Becht *et al.*, 2006)

Der Vektor enthält eine 3,7 kbp große *SfiI-SfiI*-Kassette zur Herstellung von C-terminalen mRfp-Fusionen. Des Weiteren beinhaltet es es den Terminator T_{nos} und ein Hygromylin-Resistenzgen.

pRrm4Δ-HygR □ (pUMa495; Becht *et al.*, 2006)

Der Vektor enthält 0.9 kb linke Flanke, eine Hygromylin-Resistenzkassette und 1.9 kb rechte Flanke des *rrm4*-Gens kloniert in pCR2.1-Topo. Mit diesem Plasmid werden 2376bp vom *rrm4*-ORF, ab der Nukleotid-Position -19, durch homologe Rekombination gegen ein Hygromylin-Resistenzgen ausgetauscht.

In dieser Arbeit hergestellte Plasmide:

Die hergestellten Plasmide wurden mittels molekularbiologischer Standardmethoden hergestellt und in den Vektor pCR2.1-Topo (Invitrogen) kloniert. Alle verwendeten Plasmide tragen eine Ampicillin-Resistenzkassette zur Selektion in *E. coli*. Alle Klonierungsschritte wurden durch Restriktionsanalyse überprüft, alle eingebrachten PCR-Produkte wurden auf die genomische DNA des Wildtyp-Stamm UM521 (a1b1) amplifiziert und sequenziert.

pCts1Δ-HygR (pUMa780) Plasmid für die Herstellung von Deletionsmutanten des *ctsI*-Gens. Es enthält eine 1,73 kbp große stromaufwärts des offenen Leserahmens von *ctsI* liegende Flanke, sowie eine 1,06 kbp lange stromabwärts liegende Flanke. Dazwischen wurde ein 1,8 kb großes SfiI/SfiI-Fragment aus pBS-hhn (pUMa194) eingefügt. Es enthält eine Hygromyzin-Resistenz. Das Plasmid wurde für die Integration in den endogenen *ctsI*-Locus verwendet. Die Flanken wurden mit den Primer-Kombinationen oSL64/oSL66 und oSL67/oSL69 hergestellt, wobei die Primer oSL66 SfiI (stromaufwärts) und oSL67 SfiI (stromabwärts) Restriktionsschnittstellen am 3' Ende, bzw. am 5' Ende für die Ligation mit der Resistenzkassette aufwiesen. Über homologe Rekombination wurde 1,7 kbp, beginnend bei der Nukleotidposition -77 des *ctsI*-ORFs gegen die Resistenzkassette ausgetauscht.

pCts1G-NatR (pUMa828) Plasmid für die Expression einer carboxyterminalen Fusion von Cts1 mit eGfp unter dem nativen Promotor. Es enthält eine 3,35 kbp große stromaufwärts liegende Flanke inklusive des 1,59 kbp großen offenen Leserahmens von *ctsI*, sowie eine 1,06 kbp lange stromabwärts liegende Flanke für die homologe Rekombination am *ctsI*-Locus. Dazwischen wurde eine 2,45 kb großes SfiI/SfiI-Fragment aus pMF5-1h (pUMa389) eingefügt. Es enthält *egfp*, sowie einer Nourseothrizin-Resistenz. Das Plasmid wurde für die Integration in den endogenen *ctsI*-Locus verwendet. Die Flanken wurden mit den Primer-Kombinationen oSL64/oSL145 und oSL67/oSL69 hergestellt.

ptef-eGfp-nosT/cbxR (pUMa1139) Plasmid für die Expression von zytoplasmatischem eGfp. Es enthält den Promotor P_{ref} (403bp HindIII/NcoI Fragment aus pUMa468; Zarnack *et al.*, 2006) gefolgt von einem Fragment kodierend für den *gfp*-ORF und den heterologen Terminator T_{nos} . Für die homologe Rekombination in den *ip*-Locus beinhaltet das Plasmid eine Carboxin-Resistenzkassette (*ipR*).

pRps19G-NatR (pUMa829) Plasmid für die Expression einer carboxyterminalen Fusion von Rps19 mit eGfp unter dem nativen Promotor. Es enthält eine 2,93 kbp große stromaufwärts liegende Flanke inklusive des 1,75 kbp großen offenen Leserahmens von *rps19*, sowie eine 511 bp lange stromabwärts liegende Flanke für die homologe Rekombination am *rps19*-Locus. Dazwischen wurde eine 2,45 kb großes SfiI/SfiI-Fragment aus pMF5-1h (pUMa389) eingefügt. Es enthält *egfp*, sowie einer Nourseothrizin-Resistenz. Das Plasmid wurde für die Integration in den endogenen *rps19*-Locus verwendet. Die Flanken wurden mit den Primer-Kombinationen SL87/oSL88 und SL 89/oSL90 hergestellt.

pAtp4G-3'UTR-NatR (pUMa1140) Plasmid für die Expression einer carboxyterminalen Fusion von Atp4 mit eGfp und endogener 3'UTR unter dem nativen Promotor. Es enthält eine 2,37 kbp stromaufwärts liegende Flanke inklusive des 1,44 kbp großen offenen Leserahmens von *atp4*, sowie eine 1,1 kbp lange stromabwärts liegende Flanke für die homologe Rekombination am *atp4*-Locus. Diese Flanken wurden mit den Primer-Kombinationen oSL350/oSL407 und oSL410/oSL353 hergestellt. Hier beinhaltet oSL407 eine *AscI*-Restriktionsschnittstelle für die Ligation der carboxyterminalen eGfp-Fusion und oSL410 eine *SfiI*-Restriktionsschnittstelle für die Ligation mit der Resistenzkassette. Für die carboxyterminale eGfp-Fusion wurde ein PCR-Produkt auf das Plasmid pMF5-1h (pUMa389; Becht *et al.*, 2006) mit der Primer-Kombination oSL374/oSL375 hergestellt, welche am 3' bzw. 5' Ende eine *AscI*-Restriktionsschnittstelle für die Ligation beinhalten. Die stromabwärts von eGfp ligierte endogene 3'UTR von *atp4* wurde mit der Primer-Kombination oSL408/oSL409 hergestellt, welche am 3' bzw. 5' Ende *AscI*- und *SfiI*-Restriktionsschnittstellen beinhalten. Die *SfiI*-*SfiI*-Resistenzkassette aus pMF1-n (pUMa262; Brachmann *et al.*, 2004) wurde dementsprechend zwischen endogener 3'UTR und rechter Flanke ligiert.

pAfg3G-3'UTR-NatR (pUMa988) Plasmid für die Expression einer carboxyterminalen Fusion von Afg3 mit eGfp und endogener 3'UTR unter dem nativen Promotor. Es enthält eine 3,67 kbp stromaufwärts liegende Flanke inklusive des 2,57 kbp großen offenen Leserahmens von *afg3*, sowie eine 986 bp lange stromabwärts liegende Flanke für die homologe Rekombination am *nuo2*-Locus. Diese Flanken wurden mit den Primer-Kombinationen oSL342/oSL411 und oSL412/oSL345 hergestellt. Hier beinhaltet oSL411 eine *AscI*-Restriktionsschnittstelle für die Ligation der carboxyterminalen eGfp-Fusion und oSL412 eine *SfiI*-Restriktionsschnittstelle für die Ligation mit der Resistenzkassette. Für die carboxyterminale eGfp-Fusion wurde ein PCR-Produkt auf das Plasmid pMF5-1h (pUMa389; Becht *et al.*, 2006) mit der Primer-Kombination oSL374/oSL375 hergestellt, welche am 3' bzw. 5' Ende eine *AscI*-Restriktionsschnittstelle für die Ligation beinhalten. Die stromabwärts von eGfp ligierte endogene 3'UTR von *afg3* wurde mit der Primer-Kombination oSL414/oSL413 hergestellt, welche am 3' bzw. 5' Ende *AscI*- und *SfiI*-Restriktionsschnittstellen beinhalten. Die *SfiI*-*SfiI*-Resistenzkassette aus pMF1-n (pUMa262; Brachmann *et al.*, 2004) wurde dementsprechend zwischen endogener 3'UTR und rechter Flanke ligiert.

pNuo2G-3'UTR-NatR (pUMa948) Plasmid für die Expression einer carboxyterminalen Fusion von Nuo2 mit eGfp und endogener 3'UTR unter dem nativen Promotor. Es enthält eine 2,1 kbp stromaufwärts liegende Flanke inklusive des 830 bp großen offenen Leserahmens von *nuo2*, sowie eine 1,22 kbp lange stromabwärts liegende Flanke für die homologe Rekombination am *nuo2*-Locus. Diese Flanken wurden mit den Primer-Kombinationen oSL358/oSL373 und oSL378/oSL361 hergestellt. Hier beinhaltet oSL373 eine *AscI*-Restriktionsschnittstelle für die Ligation der carboxyterminalen eGfp-Fusion und oSL378 eine *SfiI*-Restriktionsschnittstelle für die Ligation mit der Resistenzkassette. Für die carboxyterminale eGfp-Fusion wurde ein PCR-Produkt auf das Plasmid pMF5-1h (pUMa389; Becht *et al.*, 2006) mit der Primer-Kombination oSL374/oSL375 hergestellt, welche am 3' bzw. 5' Ende eine *AscI*-Restriktionsschnittstelle für die Ligation beinhalten. Die stromabwärts von eGfp ligierte endogene 3'UTR von *nuo2* wurde mit der Primer-Kombination oSL376/oSL377 hergestellt, welche am 3' bzw. 5' Ende *AscI*- und *SfiI*-Restriktionsschnittstellen beinhalten. Die *SfiI*-*SfiI*-Resistenzkassette aus pMF1-n (pUMa262; Brachmann *et al.*, 2004) wurde dementsprechend zwischen endogener 3'UTR und rechter Flanke ligiert.

pPab1G-NatR (pUMa805) Plasmid für die Expression einer carboxyterminalen Fusion von Pab1 mit eGfp unter dem nativen Promotor. Es enthält eine 3 kbp große stromaufwärts liegende Flanke inklusive des 1,9 kbp großen offenen Leserahmens von *pab1*, sowie eine 1 kbp lange stromabwärts liegende Flanke für die homologe Rekombination am *pab1*-Locus. Dazwischen wurde eine 2,45 kb großes *SfiI*/*SfiI*-Fragment aus pMF5-1h (pUMa389) eingefügt. Es enthält *egfp*, sowie einer Nourseothrizin-Resistenz. Das Plasmid wurde für die Integration in den endogenen *pab1*-Locus verwendet. Die Flanken wurden mit den Primer-Kombinationen oMF911/oSL12 und MF912/oMF914 hergestellt.

pPab1R-HygR (pUMa895) Plasmid für die Expression einer carboxyterminalen Fusion von Pab1 mit mRfp unter dem nativen Promotor. Dieses Plasmid wurde aus dem Plasmid pPab1G-NatR (pUMa805) durch den Austausch der *SfiI*-Resistenzkassette von pMF5-2h (pUMa890; Becht *et al.*, 2006) hergestellt.

Für die Komplementations-Analyse in *S. cerevisiae* wurde der Vektor pACTIIAde (pUMa399; König *et al.*, 2007) verwendet. Dieser Vektor beinhaltet die Auxotrophie-Marker *LEU2* und *ADE2*. Dieses Plasmid wurde ursprünglich im *Three-Hybrid-Assay* benutzt, um die Gal4-Aktivierungsdomäne unter der Kontrolle des *ADHI*-Promotors zu exprimieren. Das Plasmid **pRrm4G-LEU2** (pUMa1222) wurde hergestellt durch den Austausch von Gal4 mit dem entsprechenden Fragment aus dem Vektor pRrm4^{AD-G} pACTIIA (pUMa427; König *et al.*, 2007) kodierend für Rrm4 mit carboxyterminaler eGfp- Fusion. Das Plasmid **pPab1G-LEU2** (pUMa1224) beinhaltet die Integration des Fragments von pPab1G-NatR (pUMa805), kodierend für die carboxyterminale Fusion.von Pab1 mit eGfp, stromabwärts vom *ADHI*-Promoter. Dem entsprechend beinhaltet das Plasmid **pPab1R-LEU2** (pUMa1225) die Integration des Fragments von pPab1R-NatR (pUMa895), kodierend für die carboxyterminale Fusion.von Pab1 mit mRfp, stromabwärts vom *ADHI*-Promoter. Das Plasmid **pScPab1-LEU2** (pUMa1227) beinhaltet die Integration des *pab1*-ORF aus *S. cerevisiae* und ca. 760 bp der *PAB1*-3'UTR ebenfalls stromabwärts des *ADHI*-Promoters. Dieses Fragment entstammt dem Plasmid pBMK75 (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Ashe)

4.1.4 Stämme

U. maydis-Stämme:

Die Stämme in Tabelle 3 dienten in dieser Arbeit als Ausgangs- bzw. Teststämme, die in Tabelle 4 aufgelisteten Stämme wurden in dieser Arbeit hergestellt. Von allen hergestellten Stämmen wurden die homologen Rekombinationsereignisse anhand einer Southern-Analyse bestätigt.

Tabelle 4 In dieser Arbeit verwendete Ausgangsstämme

Stammbezeichnung	Genotyp	Name	Resistenz	Beschreibung
AB33	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i>	UMa133		(Brachmann <i>et al.</i> , 2001)
AB33rrm4Δ	<i>rrm4Δ</i>	UMa273		(Becht <i>et al.</i> , 2006)
AB33rrm4G/kin1Δ	<i>rrm4G kin1Δ</i>	UMa300		(Becht <i>et al.</i> , 2006)
SG200	<i>a1:mfa2 bE1bW2</i>	UMa67		(Bölker <i>et al.</i> , 1995)

Tab. 5: In dieser Arbeit hergestellte Stämme

Stamm- bezeichnung	Genotyp	UMa	integriertes Plasmid	Lokus	Ausgangss- tamm	Referenz
AB33cts1G	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i> <i>cts1G</i>	388	pCts1G-NatR (pUMa828)	<i>cts1</i>	AB33	diese Arbeit
AB33cts1G/ rrm4Δ	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i> <i>cts1G</i> <i>rrm4Δ</i>	417	pRrm4Δ-HygR □(pUMa495; Becht <i>et al.</i> , 2006)	<i>cts1</i> <i>rrm4</i>	AB33cts1G	diese Arbeit
AB33ptef- GFP	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i> <i>cbx</i>	487	ptef-eGfp- nosT/cbxR (pUMa1139)	<i>cbx</i>	AB33	
AB33ptef- GFP/rrm4Δ	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i> <i>cbx</i> <i>rrm4Δ</i>	495	ptef-eGfp- nosT/cbxR (pUMa1139)	<i>cbx</i> <i>rrm4</i>	AB33rrm4Δ	
SG200cts1Δ	<i>a1:mfa2</i> <i>bE1bW2</i> <i>cts1Δ</i>	576	pCts1Δ- HygR(pUMa780)	<i>cts1</i>	SG200	diese Arbeit
AB33cts1Δ	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i> <i>cts1Δ</i>	387	pCts1Δ-HygR (pUMa780)	<i>cts1</i>	AB33	diese Arbeit
AB33rps19G	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i>	503	pRps19G-NatR (pUMa829)	<i>rps19</i>	AB33	diese Arbeit
AB33rps19G/ rrm4Δ	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i>	494	pRps19G-NatR (pUMa829)	<i>rps19</i> <i>rrm4</i>	AB33rrm4Δ	diese Arbeit
AB33atp4G	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i>	504	pAtp4G-3'UTR- NatR (pUMa1140)	<i>atp4</i>	AB33	diese Arbeit
AB33atp4G/ rrm4Δ	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i>	560	pRrm4Δ-HygR □(pUMa495; Becht <i>et al.</i> , 2006)	<i>atp4</i> <i>rrm4</i>	AB33atp4G	diese Arbeit
AB33nuo2G	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i>	471	pNuo2G-3'UTR- NatR (pUMa948)	<i>nuo2</i>	AB33	diese Arbeit
AB33nuo2G/ rrm4Δ	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i>	484	pRrm4Δ-HygR □(pUMa495; Becht <i>et al.</i> , 2006)	<i>nuo2</i> <i>rrm4</i>	AB33nuo2G	diese Arbeit
AB33afg3G	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i>	424	pAfg3G-3'UTR- NatR (pUMa988)	<i>afg3</i>	AB33	diese Arbeit
AB33afg3G/ rrm4Δ	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i>	473	pRrm4Δ-HygR □(pUMa495; Becht <i>et al.</i> , 2006)	<i>afg3</i> <i>rrm4</i>	AB33afg3G	diese Arbeit
AB33pab1G	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i>	389	pPab1G-NatR (pUMa805)	<i>pab1</i>	AB33	diese Arbeit
AB33pab1G/ rrm4Δ	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i>	472	pRrm4Δ-HygR □(pUMa495; Becht <i>et al.</i> , 2006)	<i>pab1</i> <i>rrm4</i>	AB33pab1G	diese Arbeit
AB33rrm4G/ pab1R	<i>a2 P_{nar}bW2bE1</i>	428	pPab1R-NatR (pUMa895)	<i>pab1</i> <i>rrm4</i>	AB33rrm4G	diese Arbeit

4.2 Mikrobiologische, zellbiologische und genetische Methoden

4.2.1 Arbeiten mit *E. coli*

Kultivierung von *E. coli*

Für die Kultivierung von *E. coli* wurden dYT- und LB-Flüssigmedien und YT-Festmedium verwendet (Ausubel *et al.*, 1987; Sambrook *et al.*, 1989). Als Antibiotika wurde Ampizillin (100 µg/ml) eingesetzt. *E. coli*-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Übernachtskulturen wurden von YT-Amp-Festmedien angeimpft.

Bestimmung der Zelldichte bei *E. coli*:

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD600 die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD600 des jeweiligen Kulturmediums verwendet. Eine OD600 von 1,0 entspricht etwa 10^9 Zellen/ml.

RbCl-Transformation von *E. coli*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Cohen *et al.*, 1972). Zur Herstellung transformationskompetenter Bakterienzellen wurden 100 ml LB-Medium, dem 10 mM MgCl₂ und 10 mM MgSO₄ zugesetzt waren, mit 1 ml einer frischen DH5α-Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD600 \approx 0,5 bei 37 °C und 200 Upm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 3.000 Upm und 4°C (Heraeus Varifuge 3.0R) pelletiert und in 33 ml eiskalter RF1-Lösung resuspendiert. Nach 30 bis 60 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (15 min, 3.000 Upm, 4 °C, Heraeus Varifuge 3.0R), der Überstand abgenommen, die Zellen in 5 ml eiskalter RF2-Lösung resuspendiert und 15 min inkubiert. Die Zellsuspension wurde zu je 100 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur Transformation wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, jeweils 50 µl mit bis zu 10 µl Plasmidlösung (1-5 ng DNA) bzw. Ligationsansatz versetzt und 45 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 1 min bei 42 °C wurde der Transformationsansatz zur Expression der durch das eingebrachte Plasmid vermittelten Antibiotikaresistenz mit 500 µl dYT-Medium versetzt und 30 min bei 37 °C horizontal mit 200 Upm geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension auf YT-Platten mit 100 µg/ml Ampizillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf diese Weise konnte eine Transformationsrate von 10^6 Transformanten pro 1 µg eingesetzter Plasmid-DNA erreicht werden.

RF1-Lösung:

100 mM RbCl
50 mM MnCl₂ x 4 H₂O
30 mM K-Acetat
10 mM CaCl₂ x 2 H₂O
15% (v/v) Glycerin
in H₂Obid:
mit Essigsäure auf pH 5,8 einstellen und
sterilfiltrieren.

RF2-Lösung:

10 mM MOPS
10 mM RbCl
75 mM CaCl₂ x 2 H₂O
15% (v/v) Glycerin
in H₂Obid:
mit NaOH auf pH 5,8 einstellen und
sterilfiltrieren.

4.2.2 Arbeiten mit *U. maydis*

Kultivierung von *U. maydis*

U. maydis-Stämme wurden entweder als Schüttelkulturen bei 200 Upm oder auf Festmedien unter aeroben Bedingungen bei 28 °C kultiviert, sofern nicht anders vermerkt. Übernachtkulturen wurden von Kulturen auf Festmedien, die weniger als einen Monat bei 4 °C gelagert wurden, angeimpft. Die bei -80 °C gelagerten Glycerinkulturen wurden vor weiteren Arbeiten immer zuerst auf Festmedien ausgestrichen.

Bestimmung der Zelldichte bei *U. maydis*

Die Zelldichte von Flüssigkulturen wurde photometrisch in einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit sicherzustellen, wurden für die Messung der OD₆₀₀ die Kulturen durch entsprechende Verdünnung auf einen Wert unterhalb von 0,8 verdünnt. Als Nullwert wurde die OD₆₀₀ des jeweiligen Kulturmediums verwendet. Eine OD₆₀₀ von 1,0 entspricht etwa $1 - 5 \times 10^7$ Zellen/ml. Für die hier verwendeten Kulturen zur Herstellung von Proteinproben, Nachweis der endochitinolytischen Enzymaktivität und für die Mikroskopie wurde eine OD₆₀₀ von 0,5 verwendet.

Transformation von *U. maydis*

Dieses Protokoll ist modifiziert nach (Schulz et al., 1990) und (Gillissen et al., 1992). Von einer auf Platte wachsenden Kultur wurde eine 4 ml YEPS-Flüssigkultur angesetzt und für 8-10 h bei 28 °C geschüttelt. Diese Vorkultur wurde anschließend 1:300 in 50 ml frischem YEPS_{Light}-Medium verdünnt und bei 28 °C bis zu einer Zelldichte von $1 - 2 \times 10^7$ Zellen/ml (bis maximal OD₆₀₀ = 1,0) geschüttelt. Nach Erreichen des optimalen Zelltiters wurden die Zellen durch Zentrifugation (3.200 Upm, 10 min, 4 °C) geerntet, einmal mit 25 ml SCS gewaschen und in 2 ml SCS mit 2,5 bis 5 mg/ml Novozym resuspendiert. Die in diesem Puffer bei Raumtemperatur ablaufende Protoplastierung kann mikroskopisch verfolgt werden, da die zigarrenförmigen Zellen nach Lyse der Zellwand eine kugelige Form einnehmen. Waren etwa 1/3 der Zellen abgerundet (5 - 15 min), wurden 10 ml eiskaltes SCS zugegeben und die Protoplasten durch 10-minütige Zentrifugation bei 2.300 Upm (4 °C) pelletiert. Um das Novozym vollständig zu entfernen, wurde dieser Waschgang zweimal wiederholt. Anschließend wurde mit eiskaltem 10 ml STC gewaschen und das Pellet danach in einem Volumen von 0,5 ml eiskaltem STC aufgenommen. Die so behandelten Protoplasten können 3 - 4 h auf Eis oder aliquotiert bei -80 °C mehrere Monate aufbewahrt werden. Zur integrativen Transformation wurden 50 µl Protoplasten mit 1 - 5 µl linearisierter Plasmid-DNA (ca. 5 µg) und 1 µl Heparin-Lösung für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml STC/PEG folgte eine weitere Inkubation von 15 min auf Eis. Anschließend wurde der gesamte Transformationsansatz auf einer kurz zuvor mit Top-Agar überschichteten Regenerationsagarplatte ausgestrichen. Nach 2 bis 5 Tagen Inkubation bei 28 °C wurden die gewachsenen Kolonien mit einer Glaspipette auf antibiotikahaltigen CM- bzw. PD-Platten vereinzelt.

SCS:

20 mM Na-Citrat, pH 5,8
1 M Sorbitol
in H₂Obid.; sterilfiltriert.

STC:

10 mM Tris-Cl, pH 7,5
100 mM CaCl₂
1 M Sorbitol
in H₂Obid.; sterilfiltriert.

STC/PEG:

15 ml STC
10 g PEG4000

Induktion des filamentösen Wachstums

U. maydis Stämme wurden in CM-Flüssigmedium über Nacht bei 28° C und 220Upm bis zu einer maximalen OD₆₀₀ = 0,8 angezogen. Die Zellen wurden geerntet (Zentrifugation bei 3500 Upm für 5 min bei RT in einer Heraeus Biofuge), zweimal in NM-Glk-Flüssigmedium gewaschen und anschließend in frischem NM-Glk aufgenommen, dass exakt eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,5 erreicht wurde. Die Zellen wurden jeweils in 50 ml-Kulturen für 8 h erneut bei 28° C und 220Upm inkubiert.

Pflanzeninfektionsanalysen zur Pathogenitätsbestimmung

Als Pathogenitätstest wurde eine Spritzinfektion verwendet, bei der 200 - 250 µl einer Pilzsuspension in das Innere des Blattwirtels 7 Tage alter Maispflanzen injiziert wurde. Die entsprechenden Stämme wurden in YEPS_{Light}-Flüssigmedium bis zu einer OD₆₀₀ = 0,8 angezogen, durch Zentrifugation (3000 Upm, 5 min, RT) pelletiert und in H₂O_{bid} aufgenommen (OD₆₀₀ = 3,0). Die SG200 und SG200cts1Δ-Stämme wurden direkt injiziert. Die Bonitur erfolgte 7 und 14 Tage nach Infektion nach den im Text angegebenen Symptomklassifizierungen.

Darstellung der Mitochondrien mit *MitoTracker*[®] Red CM-H₂XRos (Invitrogen)

Jeweils 1 ml aus Sporidien- oder Filamentkulturen wurden in ein lichtgeschütztes Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit 1 µl *MitoTracker*[®] Red CM-H₂XRos (1mM Stocklösung) für 5 min bei Raumtemperatur auf einem Drehrad inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und in vorgewärmtem Medium resuspendiert und mikroskopiert. Die Epifluoreszenz wurde mit dem TexasRed- (HC562/40BP, HC593LP, HC624/40BP) Filter-Set detektiert.

Superoxid-Detektion mit *MitoSOX*TM (Invitrogen)

Jeweils 1 ml aus Sporidien- oder Filamentkulturen wurden in ein lichtgeschütztes Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit 1 µl *MitoSOX*TM Red (5mM Stocklösung) und für 5 min bei 28° C in einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit vorgewärmtem Medium gewaschen und mikroskopiert. Die Epifluoreszenz wurde mit dem TRITC- (HC543/22BP, HC562LP, HC593/40BP) Filter-Set detektiert. Die Proben für die fluorimetrische Messung der Superoxid-Produktion wurden dementsprechend hergestellt. Die anschließende Messung der relativen Fluoreszenz-Einheiten erfolgte mit jeweils 250µl der behandelten Kultur (OD₆₀₀ = 0,5) in einem Monochromatischen-Fluoreszenz-Spektrometer (Tecan Safire) bei 25° C mit den Excitation- und Emmissions-Wellenlängen von 510 nm und 580 nm (jeweils mit einer Bandbreite von 7,5 nm).

Fluorimetrische Messung der endochitinolytischen Aktivität

Die Enzymaktivität der Endochitinase wurde anhand des spezifischen Substrats 4-Methylumbelliferyl β-D-N,N',N''-triacetylchitotrioside (SIGMA Aldrich) ermittelt. Die gemessenen Kulturen entstammen alle aus 50 ml-Kulturen. Die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) wurden bei 25° C mit den Excitation- und Emmissions-Wellenlängen von 360 nm und 450 nm (jeweils mit einer Bandbreite von 7,5 nm) mit einem Monochromatischen-Fluoreszenz-Spektrometer (Tecan Safire). Dabei wurden jeweils 30 µl Sporidien- oder acht Stunden induzierte Filament-Kulturen (OD₆₀₀ = 0,5) mit 70 µl 0,25 µM Substrat für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Für die Permeabilisierung der Membran wurden die Filamente vorher mit KHM-Puffer gewaschen und dann für 2 min bei 28° C mit verschiedenen Digitonin-Kontentrationen vorinkubiert bevor die Zugabe des Substrats erfolgte. Für die Inhibitorstudie wurden 50

ml Kulturen mit vier Stunden induzierten Filamenten für weitere vier Stunden mit 20 μM Benomyl behandelt. Bei allen endochitinytischen Enzymaktivitätsmessungen wurden nur Endpunktmessungen durchgeführt, dabei wurde die Reaktion jeweils mit 200 μl 1 M Na_2CO_3 abgestoppt. Weiterhin wurde bei allen Messungen die relativen Fluoreszenzeinheiten (RFE) aus drei unabhängigen Experimenten und optimaler Verstärkungseinstellung (optimal gain settings) ermittelt ((Tecan Safire, Magellan Software; gain 128, 100, 118 und 90 für die in Abb. 16 A-D aufgeführten Messungen).

Mikroskopie und Bildverarbeitung

Für die mikroskopische Analyse wurde die Zellsuspension auf einen mit Agarose-beschichteten (2% w/v) Objektträger getropft und an einem Zeiss Axioplan II-Mikroskop mikroskopiert. Dieses Mikroskop war mit den Objektiv-Linsen Plan Neofluor und Plan Apochromat (beides 100-fache Vergrößerung, mit 1.3 und 1.4 numerischer Apertur) ausgestattet. Die Epifluoreszenz wurde analysiert mit den Gfp- (ET470/40BP, ET495LP, BP525/50) und TexasRed- (HC562/40BP, HC593LP, HC624/40BP) Filter-Sets. Für die Cy3-Detektion wurde der TRITC- (HC543/22BP, HC562LP, HC593/40BP) Filter verwendet. Alle hier verwendeten Filter waren von der Firma AHF Analysentechnik. Die Bilder wurden mit einer gekühlten CCD-Kamera (CoolSNAP HQ, Photometrics) erstellt. Das Mikroskop und die Kamera wurden durch das Programm MetaMorph 7.5 (Molecular Devices) gesteuert. Dieses Programm wurde ebenfalls für die Messungen von Regionen, die Bild- und Film-Verarbeitung und für Kontrast- und Hintergrund-Korrekturen verwendet.

Die Partikel-Intensität wurde gesteigert durch eine Pixelzusammenfassung (binning von 2×2). Für die Ko-Lokalisationsanalyse wurde ein Filterrad (Visitron Systems) verwendet mit den Excitations-Filtern für Gfp (S480/25) und Rfp (S565/25). Der Filter-Wechsel und die Detektion der Fluoreszenz wurde über den multidimensional acquisition mode gesteuert. Die Einstellungen wurden optimiert um das Ausbleichen von den Fluoreszenzsignalen zu vermeiden und resultierten in den Intervallen 225 (oder 300) ms und 670 (oder 705) ms für den Wechsel von Rfp zu Gfp und von Gfp zu Rfp. Die Emission wurde mit einem Dual-Band-Filter (Gfp: FT 480, BP503-545; Rfp: FT565, BP591-647).

4.3 Molekularbiologische Standard-Methoden

Standardtechniken, wie z.B. Aufreinigung, Fällung und elektrophoretische Auftrennung von DNA, oder Klonierungstechniken sind bei Ausubel *et al.* (1987) und Sambrook *et al.* (1989) beschrieben.

4.3.1 Die Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht $\text{OD}_{260} = 1$ einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA, 33 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger DNA, bzw. 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA. Als Maß für die Reinheit der Desoxyribonukleinsäuren diente der Quotient aus A_{260} zu A_{280} . Für reine DNA und RNA sollte er bei etwa 1,8 liegen. Niedrigere Werte weisen auf Verunreinigungen mit Proteinen hin, höhere Werte auf Verunreinigungen mit Salzen oder Zuckern. Die Messungen erfolgten in einem BioSpec UV-Spektralphotometer (Amersham) bzw. NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop-Technologies).

4.3.2 Die Isolierung von Nukleinsäuren

Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*:

Die Isolierung erfolgte durch das Prinzip "Lyse durch Kochen" nach Sambrook et al. (1989). 1,5 ml einer *E. coli*-Ü bernachtkultur wurden pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT). Das Zellpellet wurde in 300 µl STET resuspendiert, nach Zugabe von 20 µl Lysozym-Lösung kräftig geschüttelt und anschließend 40 sec bei 95° C in einem Eppendorf-Heizblock inkubiert. Die lysierten Zellenreste und die denaturierte genomische DNA wurden 15 min bei 13.000 Upm abzentrifugiert und danach mit einem sterilen Zahnstocher aus der wässrigen Lösung entfernt. Die Reinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Fällung mit 40 µl 3 M Na-Acetat, pH 5,3 und 400 µl Isopropanol bei RT für 5 min und anschließender Zentrifugation für 5 min bei 13.000 Upm. Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und nach Trocknen in 200 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen. Mit dieser Methode gelang es routinemässig, aus 1,5 ml Ü bernachtkultur etwa 50 µg Plasmid-DNA zu isolieren.

STET:

50 mM Tris-Cl, pH 8,0
50 mM Na₂-EDTA
8% (w/v) Saccharose
5% (v/v) Triton X-100
in H₂O_{bid}:

Lysozym-Lösung:

10 mg/ml Lysozym
10 mM Tris-Cl, pH 8,0
in H₂O_{bid}:

DNA-Isolierung aus *U. maydis*:

Diese Methode ist modifiziert nach Hoffman und Winston (1987). Dabei wurden 1,5 ml einer Ü bernachtkultur in YEPSL-Flüssigmedium zusammen mit 0,3 g Glasperlen in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß pelletiert (13.000 Upm, 30 sec, RT), der Ü berstand abgegossen und das Pellet in 400 µl *Ustilago*-Lysispuffer und 400 µl TE-phenol/Chloroform aufgenommen. Die Proben wurden für 10 min auf einem Vibrax-VXR Schüttler (IKA) geschüttelt. Nach Phasentrennung (13.000 Upm, 5 min, RT) wurden 400 µl des Überstands in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml Ethanol gefällt. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 30 sec, RT) wurde das Pellet in 50 µl TE mit 20 µg/ml RNase A aufgenommen, bei 50° C resuspendiert und bei -20° C aufbewahrt.

Ustilago-Lysispuffer:

50 mM Tris-Cl, pH 7,5
50 mM Na₂-EDTA
1% (w/v) SDS
in H₂O_{bid}:

TE-Phenol/Chloroform:

Mischung aus gleichen Teilen Phenol (mit TE-Puffer äquilibriert) und Chloroform

4.3.3 Auftrennung und Nachweis von Nukleinsäuren

Transfer von DNA (Southern-Analyse):

Diese Methode ist modifiziert nach Southern (1975). Der Transfer der aufgetrennten DNA-Fragmente aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte durch Kapillar-Blot. Hierbei wird die Transfer-Lösung (20x SSC) aus einem Pufferreservoir über Kapillarkräfte durch das Gel hindurch in einen auf dem Gel platzierten Stapel Papierhandtücher gesaugt. Die DNA-Fragmente werden durch den Pufferstrom aus dem Gel eluiert und binden an die darüberliegende Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech). Vor dem Transfer wurde das Agarosegel für jeweils 20 min in 0,25

M HCl, DENAT- und RENAT-Lösung inkubiert, um u.a. einen Teil der Purine abzuspalten und damit den Transfer großer DNA-Fragmente zu erleichtern. Der Kapillar-Blot erfolgte über Nach. Anschließend wurde die Membran 15 min getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (1200mJcm^{-2}) in einem StratalinkerR (Stratagene) fixiert.

20x SSC:

3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat*2H₂O
in H₂Obid:
pH-Wert mit HCl auf 7,0 einstellen.

DENAT-Lösung:

1,5 M NaCl
0,4 M NaOH
in H₂Obid:

RENAT-Lösung:

1,5 M NaCl
282 mM Tris-HCl
218 mM Tris-Base
in H₂Obid:

Der spezifische Nachweis immobilisierter Desoxyribonukleinsäure

Genspezifische Sonden wurden durch den Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (DIG) während einer PCR markiert. Ein PCR-Ansatz enthielt 10 - 100 pg Plasmid-DNA oder 100 ng genomische DNA, 5 µl PCR-Puffer, 5 µl PCR-DIG-Labeling-Mix (Roche, siehe Herstellerangaben), jeweils 20 pmol der beiden Oligonukleotide und 0,5 µl Taq-DNA-Polymerase (mit H₂Obid: auf 50 µl aufgefüllt). Die Reaktion erfolgte in einem Thermocycler PTC200 (MJ Research) analog einem Standard-PCR-Ansatz.

Die Hybond-N+-Membranen (GE Healthcare) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Southern-Hybridisierungspuffer für 20 min bei 62° C präinkubiert. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die für 5 min bei 95° C denaturierte Sonde zugegeben und über Nacht bei 62° C hybridisiert. Im Anschluss wurden die Filter für je 15 min bei 62° C mit 2xSSPE+0,1%SDS, 1xSSPE+0,1%SDS und 0,1xSSPE+0,1%SDS gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran bei Raumtemperatur unter langsamem Schwenken in folgenden Lösungen inkubiert: 5 min DIG-Waschpuffer, 30 min DIG2-Lösung, 30 min DIG2-Antikörper-Lösung (1:20.000 Anti-Digoxigenin-AB Fab-Fragmente (Roche) in DIG2-Lösung) und zweimal 20 min in DIG-Waschpuffer. Danach wurde die Membran für 5 min in DIG3-Lösung äquilibriert und anschließend für 5 min in Chemilumineszenz-Lösung (1:100 CDP-Star (Roche) in DIG3-Lösung) inkubiert. Die Membran wurde luftblasenfrei in einen Plastikbeutel eingeschweißt und gemeinsam mit einem Film in einer lichtdichten Kassette verschlossen. Nach einer Expositionszeit von durchschnittlich 10 min wurde der Film entwickelt.

Southern-Hybridisierungspuffer:

50 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0

50 mM PIPES
100 mM NaCl
1 mM Na₂-EDTA
5% (w/v) SDS
in H₂Obid:

Southern-Waschpuffer:

1x SSC
0,1% (w/v) SDS

DIG1-Lösung:

0,1 M Maleinsäure
0,15 M NaCl
in H₂Obid:
pH-Wert mit NaOH auf 7,5 einstellen.

DIG2-Lösung:

2% (w/v) Magermilchpulver

in DIG1-Lösung

DIG-Waschpuffer:

0,3% Tween-20
in DIG1-Lösung

DIG3-Lösung:

0,1 M Tris-HCl
0,1 M NaClin H₂Obid:
in H₂Obid:
pH-Wert mit NaOH auf 9,5
einstellen.

RNA-Isolierung nach der Trizol®-Methode:

Diese Methode orientiert sich am Protokoll der Firma Invitrogen und wurde zur Präparation von Gesamt-RNA aus *U. maydis*-Flüssigkulturen verwendet: 25 ml Zellkultur (OD600 = 0,5) wurden pelletiert (3.500 Upm, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren (ggf. Aufbewahrung bei -80 °C). Auf das tiefgefrorene Zellpellet wurde 1 ml Trizol pipettiert, dieser Ansatz kurz gevortext und nach Zugabe von ca. 0,3 g Glasperlen (150212 microns; Sigma) für 5 min auf einer Retsch-Kugelmühle bei einer Frequenz von 30 Hz aufgeschlossen. Nach Inkubation bei RT für 5 min wurden 200 µl Chloroform zugegeben. Die Ansätze wurden anschließend kurz gevortext und 2-3 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (13.000 Upm, 4 °C, 15 min) wurde die wässrige Phase abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 500 µl Isopropanol 10 min bei RT gefällt. Nach einer erneuten Zentrifugation (13.000 Upm, 4 °C, 10 min) wurde die pelletierte RNA mit 75 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 Upm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 5 min bei RT getrocknet, anschließend in 50 µl Nuklease-freiem H₂O (Ambion) aufgenommen und für 10 min bei 55 °C resuspendiert. Eine Quantitäts- und Qualitätskontrolle erfolgte durch photometerische Messung am NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer.

Transfer von RNA

Der Transfer der Nukleinsäuren auf eine Nylonmembran (Hybond-XXL, GE Healthcare) erfolgte durch Kapillar-Blot in 20x SSC mindestens für 3 h. Vor dem Transfer wurden die MOPS-RNA-Gele für 15 min in 20x SSC äquilibriert. Anschließend wurde die Membran getrocknet. Ein Nachweis der transferierten 18S- und 28S-rRNA-Banden auf der Membran wurde mittels Färbung mit Methylenblau (200 mg/l in 300 mM Na-Acetat) durchgeführt. Dazu wurde die Membran in der Färbelösung 5 min inkubiert, anschließend mit H₂O gewaschen, getrocknet und das Bandenmuster photographisch dokumentiert.

Spezifischer Nachweis immobilisierter Ribonukleinsäure

Die Hybond-XXL-Membranen (GE Healthcare) wurden zur Absättigung der unspezifischen Bindungsstellen mit Hybridisierungspuffer für 20 min bei 60 °C präinkubiert. Für die radioaktive Sonde benötigte man 50-1000 ng DNA in 33 µl H₂O. Die DNA wurde für 5 min bei 100°C denaturiert und auf Eis gestellt. Es wurde 5 µl 10x Labeling-Puffer und 6 µl dCTP-freie dNTPs hinzugefügt. Im Isotopenlabor wurden 1 µl Klenow-Enzym an den Eppli-Rand pipettiert und 5 µl 32P dCTP (50 µCi) hinzugegeben, anzentrifugiert und für 1,5- 2 h bei 37°C inkubiert (Bleideckel drauf stellen). Die Sonde wurde dann auf eine S300-Säule gegeben und in einem Eppli für 2 min bei 2800 rpm zentrifugiert. Die gereinigte Sonde konnte nach Denaturierung (10 min; 95°C) direkt eingesetzt werden. Nach Wechsel der Hybridisierungslösung wurde die bei 95 °C für 5 min denaturierte radioaktive Hybridisierungsprobe zugegeben (Endkonzentration etwa 106 cpm/ml). Spezifische Hybridisierung erfolgte bei 60 °C über Nacht. Die Filter wurden zweimal je 15 min bei 60 °C mit Waschpuffer gewaschen. Schließlich wurden die Filter in Plastikfolie eingeschweißt und in Kassetten für den Phosphorimager STORM840 (Molecular Dynamics) exponiert. Nach 12 bis 24 Stunden wurden die strahlungssensitiven *Screens* der Kassetten im Phosphorimager eingelesen und mit dem Computerprogramm IMAGEQUANT (Molecular Dynamics) bearbeitet.

Northern-Hybridisierungspuffer:

5% (v/v) 1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,0 (f.c. 50 mM)
 5% (v/v) 1 M PIPES pH 7,0 (f.c. 50 mM)
 2% (v/v) 5 M NaCl (f.c. 100 mM)
 25% (v/v) 20% SDS (f.c. 5%)
 0,2% (v/v) 0,5 M EDTA pH 8,0 (f.c. 1 mM)
 Mit Seradest-H₂O auf das entsprechende
 Volumen auffüllen.

Northern-Waschpuffer:

5% (v/v) 20x SSC (f.c. 1x)
 25% (v/v) 20% SDS (f.c. 5%)
 Mit Seradest-H₂O auf das entsprechende
 Volumen auffüllen.

4.3.4 Sequenz- und Strukturanalyse

Sequenzierung von DNA:

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Zentralabteilung DNA am Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung (MPIZ) in Köln durchgeführt. Verwendet wurden dort Sequenzierautomaten AbiPrism 377, 3100 und 3730 (Applied Biosystems) sowie das Sequenzier-Kit BigDye-Terminator v3.1 (Applied Biosystems). Die erhaltenen Daten wurden mit den Programmen SEQUENCHER 4.1 (Genecodes) oder CLONEMANAGER (Version 7 und Version 8; Sci Ed Central) ausgewertet.

Sequenzanalyse:

SEQUENCHER 4.1 (Genecodes) zur Bearbeitung von Sequenz-Rohdaten und zum Vergleich von DNA-Sequenzen.

CLONEMANAGER (Version 7 und Version 8; Sci Ed Central) zur Erstellung und Bearbeitung von Plasmid-DNA und genomischen Sequenzen, zum erstellen von Primern und zeichnen von genetischen Karten.

BLAST2 (Altschul et al., 1990, 1997; Gish und States, 1993) zur Identifizierung ähnlicher Proteine oder DNA-Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken.

MEME (Bailey et al., 2006; <http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>) zur Identifizierung und Analyse wiederkehrender Sequenzmotive.

MAST (Bailey und Gribskov, 1998; <http://meme.sdsc.edu/meme/intro.html>) zur Suche nach vorgegebenen Sequenzmotiven.

4.3.5 PCR-Techniken

Standard-PCR-Ansätze:

Die Methode ist modifiziert nach Innis et al. (1990). Ein typischer PCR-Ansatz enthielt etwa 10 ng Matrizen- DNA, zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (f.c. 1 µM) und 125 µM (f.c.) dNTPs (d.h. je 200 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in PCR-Puffer. Standardmäßig wurden die Reaktionen in einem Volumen von 50 µl durchgeführt, zur Vermeidung von Kontaminationen wurden Pipettenspitzen mit Filtereinsatz benutzt. Bei einer Amplifikatlänge von unter 1 kb sah ein typisches Protokoll folgendermaßen aus: Denaturierung bei 94° C für 2 min, Zugabe von 1-2 U Taq Dna-Polymerase (Hot Start), Denaturierung bei 94° C für 1 min, 30 Zyklen mit jeweils 30 sec Denaturierung bei 94° C, 30 sec Anlagerung bei 65° C und 1 min Elongation bei 72° C, mit einer abschließenden Elongationsphase von 10 min bei 72° C. Bei der Herstellung von längeren Amplifikaten wurde die Elongationszeit entsprechend angepasst. Die Reaktionen erfolgten im Thermocycler (PTC 100 oder PTC 200, MJ Research).

4.4 Protein-Analysen

4.4.1 Präparation der Proben für die 2D-SDS-PAGE und Western-Analyse

Die Proteinproben wurden aus 50 ml ($OD_{600} = 0,5$) Sporidien- oder acht Stunden induzierten Filamentkulturen hergestellt. Die Kulturen wurden abzentrifugiert (860 g für 5 min bei 4°C), der Überstand restlos beseitigt und das Pellet in 2 ml Lysepuffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in vorgefrorenen Stahlgefäße pipettiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Hilfe einer Kugelmühle aufgeschlossen (Retsch; 5 min; Frequenz 30 s⁻¹). Die Proben wurden in Eppendorf-Gefäße überführt und erneut abzentrifugiert (860 g für 5 min bei 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und ein Aliquot für die Fraktion des Gesamtzellextraktes entnommen. Nach erneuter Zentrifugation (51.590 g für 30 min bei 4°C) bildete dieser Überstand die zytosolische Proteinfraction und wurde entnommen. Aus den hergestellten Proben des Gesamtzellextraktes und der zytosolischen Proteinfraction konnte eine quantitative Proteinkonzentrationsbestimmung nach der Bradford-Methode durchgeführt werden. Das verbliebene Membran-Pellet wurde zweimal mit Lysepuffer gewaschen, in 800 µl Membranproteinpuffer resuspendiert und für mindestens fünf Stunden bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden die Proben noch für eine Stunde auf einen Schüttler bei 4°C bei der niedrigsten Stufe gevortext. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (51.590 g für 30 min bei 4°C) und der Überstand bildete die Membran-assoziierte Proteinfraction.

Lysepuffer

100 mM NaPi, pH 8
10 mM Tris/HCl, pH 8,
8 M Urea
2 x Complete Proteinaseinhibitor-Cocktail
in H₂O_{bid}.

Membranproteinpuffer

10 mM Tris Acetat pH 7,6
1 mM MgAc
0,1 mM EDTA
8% Glyzerin
4 mM dodecyl-β-D-maltoside
0,7 mM cholesterol hemisuccinat
0,1% Triton X-100
2 x Complete Proteinaseinhibitor-Cocktail (Roche) in H₂O_{bid}.

4.4.2 Präparation von Mitochondrien

Die Präparation von Mitochondrien wurde aus Filamenten in MIB-Puffer (0.6 M Mannitol, 20 mM HEPES-KOH, pH 7.4) hergestellt (Bortfeld et al., 2004; Mahlert et al., 2009). Die Protein-Konzentration wurde nach dem Protokoll von Yaffe gemessen (Yaffe, 1991). Die isolierten Mitochondrien (50 µg Protein) wurden in MIB/PMSF-Puffer gewaschen und bei 98° C im SDS-Ladepuffer für 5 min gekocht (Mahlert et al., 2009). Die Proben wurden in einem 10%igem SDS-Gel aufgetrennt und in einer Western-Analyse mit den spezifischen Antikörpern detektiert.

4.4.3 Nachweis von immobilisierten Proteinen (Western-Analyse)

Für die Western-Analyse wurden 20µg vom Gesamtzellextrakt und der zytosolischen Proteinfraction und 20µl der Membran-assoziierten Proteinfraction eingesetzt. Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte in einem 10%igem Standard-SDS-Gel (Laemmli, 1970). Der immunologische Nachweis von Proteinen erfolgte mit Hilfe der an den sekundären Antikörper gekoppelten Meerrettich-Peroxidase (HRP). Dazu wurde die PVDF-Membran nach dem Membrantransfer (Western-Blot semi dry) für

mindestens 20 min mit 3% Magermilchpulver in TBST geblockt. Anschließend wurde die Membran für 1 - 24 h mit dem primären Antikörper (entweder Anti-Gfp, Roche; α -Tub-Antikörper; Merck4Biosciences oder Anti-CCHL Antkörper, zur Verfügung gestellt von C. Basse) in TBST mit 3% Magermilchpulver, inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min in TBST wurde die Membran für 1 - 12 h mit dem sekundären Antikörper in TBST mit 1% Magermilchpulver, inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBST und einmal für 5 min mit TBS gewaschen. Der Nachweis erfolgte mit dem ECL plus Western blotting detection System von GE Healthcare.

TBST:

20 mM Tris-HCl, pH 7,6

136 mM NaCl

0,05% (v/v) Tween 20

2D-SDS-PAGE

4.4.4 2D-SDS-PAGE

Für die Herstellung der präoperativen 2D-Gele wurde 800 μ l der Membran-assoziierten Proteinfraction mit 800 μ l 20% TCA (Trichloressigsäure) versetzt und über Nacht bei 4° C gefällt. Die Fällung der Proteine wurde nach publiziertem Protokoll durchgeführt (Görg et al., 1997). Nach der Fällung wurde das Pellet fünf-mal mit eiskaltem Aceton (-20° C) gewaschen. Und in 500 μ l Rehydrierungspuffer resuspendiert. Die 24 cm langen Immobiline Drystrips IPG pH 3-11 wurden nach der aktiven Rehydratisierungsstrategie mit den Proben für 12 h rehydratisiert (Rabilloud et al., 1994). Die anschließende isoelektrische Fokussierung erfolgte in einer Ettan IPGphor II (GE Healthcare) bei einer maximalen Temperatur von 20°C, 50 μ A/Strip mit den folgenden Schritten: (1): steigender Gradient bis zu 500 V in 4 h, (2) kontinuierlich 500 V für 4 h, (3) steigender Gradient bis 3500 V in 5 h und (4) kontinuierlich 3500 V für 13 h bis 59 000 Vh erreicht sind. Danach wurden die IPG-Strips für die zweite Dimension equilibriert. Dies erfolgte in zwei Schritten für jeweils 15 min im Äquibrierungspuffer mit 0,5% DTT und dann mit 2% Jodacetamid. Nach der Äquibrierung wurden die IPG-Strips über einem 10%igem SDS-Gel mit Agarose befestigt. Die Auftrennung der zweiten Dimension erfolgte mit einem Ettan Dalt Six gel system (GE Healthcare). Der Gellauf erfolgte für 2h bei 1 W/Gel und für 12-16 h bei 3W/Gel. Die Gele wurden anschließend nach Herstellerangaben mit dem fluoreszierenden Farbstoff Deep Purple (GE Healthcare) angefärbt und mit Hilfe des Typhoon 9410 (GE Healthcare) visualisiert. Die Analyse der Protein-Spezies und die Erstellung einer Pick-Liste wurde mit der Analysen-Software DeCyderTM software (GE Healthcare) durchgeführt und die zugeordneten 10 Protein-Varianten wurden mit einem automatisiertem Ettan Spot Picker (GE Healthcare) aus dem Gel herausgestanzt.

Rehydrierungspuffer

8 M Urea
 2% (w/v) CHAPS
 0,5% Ampholyte (pH 3-11)
 Bromphenolblau
 10 mM DTT
 in H₂O bid.

SDS-Äquilibriumspuffer

50 mM Tris/HCl; pH 8,8
 6 M Urea
 30% Glycerin
 2% SDS
 0,002% Bromphenolblau
 + DTT (100 mg auf 10 ml) oder
 + Iodacetamide (250 mg auf 10 ml)
 in H₂O bid.

4.4.5 Protein Identifizierung mit LC-MS/MS

Die Proteine in den herausgestanzten Gelstücke wurden im Gel mit Trypsin (Promega) verdaut und nach der Elution der Peptide wurden diese mit LC-ESI-MS/MS anhand eines Ionenfallen-Massenspektrometers (LTQ, Thermo Scientific, Hemel Hempstead, U.K.) analysiert. Dies wurde in Zusammenarbeit mit Dr. F. Kaffarnik durchgeführt. Ein nano-HPLC-System (Surveyor, Thermo Scientific) wurde verwendet, um die Peptidlösung mit einer Flussgeschwindigkeit von 250 nl/min dem Massenspektrometer zuzuführen. Eine Entsalzung der Peptidlösung erfolgte mittels einer C18-Vorsäule und einer nachgeschalteten 8 cm langen C18-Säule (Picotip, 75 µm Innendurchmesser, 15 µm tip; New Objective). Die Peptide wurden mit einem 2-60% igem Acetonitril-Gradienten innerhalb von 35 min eluiert. Das Massenspektrometer wurde im Ein-Ionen-Modus betrieben und über eine Excalibur Software gesteuert. Des Weiteren war es mit einer Nanospray-Quelle ausgestattet, welche mit einer Kapillartemperatur von -200° C betrieben wurde. Die weitere Daten-Analyse wurde aus den sechs am häufigsten detektierten Ionen in jedem Zyklus erhoben. Der Massenspektrometrische-Bereich des Masse/Ladung (m/z) Verhältnisses betrug 300-2000, das Minimum Signal 1000, die normalisierte Kollisionsenergie 30 und fünf wiederholte Treffer. Die Isolationsbreite für die MS/MS-Messung war 2 m/z . Die Analyse der Daten wurde mit dem Programmpaket BioWorks 3.2 (Thermo Scientific) mittels des SEQUEST Protein-Identifizierungs-Algorithmus ausgeführt. Die Fragment-Ionenspektren wurden gegen die *U. maydis* Protein-Datenbank MUMDB verglichen (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>; release March 2006; 6892 predicted protein-coding genes; Kämper *et al.*, 2006; 12; Anhang Table 1). Die Suchkriterien beinhalteten die Oxidation von Methionin als variable Modifizierung und die Alkylierung von Cysteinen als feststehende Modifikation.

4.5 Phylogenetische Analyse von Endochitinasen

Diese Analyse wurde in Kooperation mit R. Kellner und Dr. D. Begerow von der Ruhr-Universität in Bochum (Abteilung für Geobotanik) durchgeführt. Es wurden 80 Sequenzen von Endochitinasen aus zugänglichen Genom-Datenbanken ausgesucht. Diese beinhalteten 72 pilzliche Endochitinase-Sequenzen einschließlich den folgenden Vertretern der Basidiomyceten (*C. neoformans*, *L. bicolor*, *M. globosa*, *P. graminis* and *U. maydis*) und den Ascomyceten (*S. cerevisiae*, *S. pombe*, *A. fumigatus* and *H. jecorina*). Für einen besseren Vergleich mit vorherigen phylogenetischen Chitinase-Analysen wurden alle Chitinasen aus *A. fumigatus* (Taib *et al.*, 2005) und *H. jecorina* (Seidl *et al.*, 2005) in diese Analyse einbezogen. Die verbleibenden acht Sequenzen entstammten ausgewählten Bakterien (*S. marcescens*, *V. fisheri*, und *V. harveyi*) und höheren Pflanzen (*N. tabacum* und *A. thaliana*). Die entsprechenden Zugangsnummern (Accession numbers) sind unten angegeben.

Ein Sequenzabgleich von 3890 Aminosäuren wurde mit dem Programm PCMA v2.0 (Pei et al., 2003) in einem Standard-Modus durchgeführt. Durch den Ausschluss der sehr hoch-variablen N- und C- terminalen Bereiche wurde die Analyse anhand von 1028 Aminosäuren berechnet, wobei das katalytische Zentrum der Endochitinasen mit einbezogen war. Der Sequenz-Abgleich berücksichtigte das erste bis zum letzten gemeinsame Motiv, mit mehr als vier Aminosäuren, in jeder Sequenz. Die anschließende Maximum Likelihood (ML) Analyse wurde mittels RAXML 7.0.4 (Stamatakis, 2006) durchgeführt. Die Berechnung der 1000 Bootstrap Replikate erfolgte unter dem schnelleren Bootstrap Algorithmus, dessen PROTCAT Annäherung die BLOSUM62 Matrix verwendet. Die darauf folgende ML Suche nach dem besten ML Baum startete jeweils bei jedem fünften Bootstrap Baum unter Verwendung der akkurateren PROTGAMMA Annäherung und gleicher Substitutionsmatrix.

Zugangsnummern (Accession numbers): Mg1, XP_001731836; Sc1, EDZ70510; Sc2, YLR286C; Sc3, YDR371W; Sp1, SPAPB1E7; Cn1, CNAG_03412; Cn2, XP_774325; Cn3, XP_567647; Cn4, XP_772895; Cn5, XP_572898; Cn6, XP_572898; Cn7, XP_775481; Cn8, CNAG_02598; Af1, EDP48356; Af2, EDP49138; Af3, XP_747065; Af4, AAP23218; Af5, XP_747959; Af6, XP_747135; Af7, XP_747991; Af8, XP_754895; Af9, XP_748995; Af10, XP_748766; Af11, XP_754491; Af12, XP_747968; Af13, XP_750029; Af14, XP_750867; Af15, XP_753949; Af16, XP_750818; Af17, XP_747948; Hj1, DAA05849; Hj2, DAA05850; Hj3, DAA05851; Hj4, DAA05852; Hj5, DAA05853; Hj6, DAA05854; Hj7, DAA05855; Hj8, DAA05856; Hj9, DAA05857; Hj10, DAA05858; Hj11, DAA05859; Hj12, DAA05860; Hj13, DAA05861; Hj14, DAA05862; Hj15, DAA05863; Hj16, DAA05864; Hj17, DAA05865; Hj18, DAA05866; Lb1, XP_001877721; Lb2, XP_001886180; Lb3, XP_001877452; Lb4, XP_001887313; Lb5, XP_001877020; Lb6, XP_001887312; Lb7, XP_001878726; Lb8, XP_001883483; Lb9, XP_001883487; Pg1, PGTG02094; Pg2, PGTG02187; Pg3, PGTG10407; Pg4, PGTG05680; Pg5, PGTG15572; Pg6, PGTG05714; Pg7, PGTG07009; Pg8, PGTG15122; Pg9, PGTG15914; Pg10, PGTG18387; Pg11, PGTG18437; Pg12, PGTG05703; Pg13, PGTG08849; Sm1, P07254; Sm2, ABI31431; Vf1, YP_002156415; Vh1, ZP_01987824; Vh2, YP_001448065; Nt1, Z11563; Nt2, Z11564; und At1, AAA32768.

4.6 Nachweis von RNA in situ (FISH-Analysen)

4.6.1 Fixierung und Vorbereitung der Filamente

Das Protokoll für die FISH-Analyse in *U. maydis* wurde unter Berücksichtigung des FISH-Protokolls aus *S. cerevisiae* entwickelt (Long et al., 1995; <http://www.singerlab.org/protocols>) und wurde in dieser Arbeit nach der modifizierten Vorgehensweise durchgeführt (König et al., 2009). In der Vorbereitung wurden zunächst Multiwell-Objektträger (Diagnostica-Objektträger von Menzel Gläser, Epoxy Beschichtung weiß, 12 Felder 5mm Drm; Kobe No. 9161185) mit H₂O bid. gewaschen und unter der Sterilbank getrocknet. Pro Vertiefung wurden 5 µl 0,025% poly-L-Lysine (Sigma No. P8920) addiert und für 3 min inkubiert. Nach dem Entfernen von 3 µl wurden die Objektträger unter der Sterilbank getrocknet. Anschließend wurde dreimal 10 min mit H₂O bid. gewaschen. Nach erneutem Trocknen wurden die Objektträger bei 4° C gelagert.

Für das Experiment wurden Vorkulturen der entsprechenden Stämme in 2 ml CM-Glk angeimpft und über Nacht bei 28° C und 220 Upm inkubiert. Die am nächsten Tag

angeimpften 50 ml CM-Glk-Hauptkulturen wurden erneut über Nacht bei 28° C und 220 Upm inkubiert. Die Zellen wurden bei einer OD600=0,5 durch 5 min Zentrifugation bei 3000 Upm pelletiert. Für die Filament-Induktion wurde das Pellet gewaschen und in 50 ml NM-Glk resuspendiert und für 8 h bei 28° C und 220 Upm inkubiert. Für die Fixierung der induzierten Filamente wurden 15 ml der Kultur zu 5 ml Formaldehyd (16%) gegeben und 1 h bei 28° C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit 10 ml PufferB gewaschen (Zentrifugation 5 min bei 8500 Upm) und das Pellet in 250 µl PufferB aufgenommen. Davon wurden in jede Vertiefung eines beschichteten Objektträgers 5 µl gefüllt und 30 min bei 4° C inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgesaugt und der Objektträger zweimal 5 min mit PufferB gewaschen. Um Wasser zu entziehen, wurden die Objektträger in Ethanol (70%) bei -20° C gelagert.

PufferB:

1,2 M Sorbitol
100 mM Kphosphate, pH 7,4
in H₂O_{bid}.

Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4:

802 mM K₂HPO₄
198 mM KH₂PO₄
in H₂O_{bid}.

4.6.2 in situ-Hybridisierung

Die Objektträger wurden 5 min in 2x SSC-Puffer rehydriert und mindestens 5 min in 2x SSC-Puffer mit 40% Formamid gewaschen, in dem sie bis zur weiteren Verarbeitung verblieben. Anschließend wurden 24 µl H1-Lösung und 6 µl Oligomix vereint, 3 min bei 80° C inkubiert und auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 30 µl H2-Lösung addiert, wonach die Reaktion 10 min bei 13000 Upm zentrifugiert wurde. Pro Objektträger-Vertiefung wurden 5 µl Reaktionsgemisch addiert. Die Vertiefungen wurden mit einem Deckgläschen verschlossen und der Objektträger in einem lichtundurchlässigen und luftdichten Inkubationsgefäß über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Reaktionsgemisch entfernt und der Objektträger zweimal für 30 min in 2x SSC mit 40 % Formamid bei 37° C und 150 Upm gewaschen. Nach Entfernen der restlichen Flüssigkeit wurden pro Vertiefung 5 µl DAPI-MIX (Vectas H1200) addiert. Die Vertiefungen wurden mit einem Deckgläschen abgedeckt und die Objektträger bis zur Mikroskopischen Analyse bei 4° C in einem lichtundurchlässigen und luftdichten Inkubationsgefäß gelagert.

H1-Lösung:

49,3 µl Formamid
0,63 µl Natriumphosphat-Puffer (1M)

Oligomix:

1 µl je Gfp-Sonde (#1-4; 20pmol/µl)
10 µl Heringssperma-DNA (10mg/ml)
10 µl tRNA (10 mg/ml)
6 µl H₂O_{bid}.

H2-Lösung:

24,6 µl BSA (10 mg/ml; NEB)
23,9 µl H₂O_{bid}
12,3 µl 20x SSC
0,75 µl RNasin (40 U/µl; Promega)

20x SSC-Puffer:

3 M NaCl
0,3 M Natriumcitrat*2H₂O
in H₂O_{bid}.
pH mit HCl auf 7,0 einstellen

10x PBS-Puffer, pH 7,2:

113 mM NaH₂HPO₄
18 mM KH₂PO₄
27 mM KCl
1,37 M NaCl
in H₂O_{bid}.

4.7 Maximaquantifizierung mit PIA

Das Programm PIA (peak-identifying algorithm; entwickelt von K. Zarnack, J. König and M. Feldbrügge; König *et al.*, 20009). Der Algorithmus detektiert die Positionen von lokalen Maxima mit der Mindesthöhe h eines zweidimensionalen diskreten Graphen (bis zu einer maximalen Distanz w auf beiden Seiten). Die Identifizierung der Maxima wurde hier mit den Parametern $h = 130$ und $w = 8$ (die Werte wurden anhand der variierenden Signal-Intensitäten optimiert).

5 Literaturverzeichnis

- Adam-Vizi V, Chinopoulos C (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* **27**: 639-645
- Alban A, David SO, Bjorkestén L, Andersson C, Sloge E, Lewis S, Currie I (2003) A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. *Proteomics* **3**: 36-44
- Angelini M, Cannata S, Mercaldo V, Gibello L, Santoro C, Dianzani I, Loreni F (2007) Missense mutations associated with Diamond-Blackfan anemia affect the assembly of ribosomal protein S19 into the ribosome. *Hum Mol Genet* **16**: 1720-1727
- Arlt H, Steglich G, Perryman R, Guiard B, Neupert W, Langer T (1998) The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease. *EMBO J* **17**: 4837-4847
- Arlt H, Tauer R, Feldmann H, Neupert W, Langer T (1996) The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. *Cell* **85**: 875-885
- Aronov S, Gelin-Licht R, Zipor G, Haim L, Safran E, Gerst JE (2007) mRNAs encoding polarity and exocytosis factors are cotransported with the cortical endoplasmic reticulum to the incipient bud in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **27**: 3441-3455
- Ausubel FM, Brenz R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Strukl K (1987) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc., USA.
- Badhai J, Frojmark AS, E JD, Schuster J, Dahl N (2009a) Ribosomal protein S19 and S24 insufficiency cause distinct cell cycle defects in Diamond-Blackfan anemia. *Biochim Biophys Acta* **1792**: 1036-1042
- Badhai J, Frojmark AS, Razzaghian HR, Davey E, Schuster J, Dahl N (2009b) Posttranscriptional down-regulation of small ribosomal subunit proteins correlates with reduction of 18S rRNA in RPS19 deficiency. *FEBS Lett* **583**: 2049-2053
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**: 483-495
- Banuett F (1995) Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induces tumors in maize. *Annu Rev Genet* **29**: 179-208
- Banuett F, Herskowitz I (1989) Different *a* alleles of *Ustilago maydis* are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5878-5882
- Banuett F, Herskowitz I (1996) Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* **122**: 2965-2976
- Bartnicki-Garcia S (2006) Chitosomes: past, present and future. *FEMS Yeast Res* **6**: 957-965
- Basse CW, Steinberg G (2004) *Ustilago maydis*, model system for analysis of the molecular basis of fungal pathogenicity. *Mol Plant Pathol* **5**: 83-92
- Becalska AN, Gavis ER (2009) Lighting up mRNA localization in *Drosophila* oogenesis. *Development* **136**: 2493-2503
- Becht P, König J, Feldbrügge M (2006) The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. *J Cell Sci* **119**: 4964-4973
- Becht P, Vollmeister E, Feldbrügge M (2005) Role for RNA-binding proteins implicated in pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Eukaryot Cell* **4**: 121-133

- Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM (1998) Localization of *ASH1* mRNA particles in living yeast. *Mol Cell* **2**: 437-445
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Gorg A, Westermeier R, Postel W (1982) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods* **6**: 317-339
- Böhl F, Kruse C, Frank A, Ferring D, Jansen RP (2000) She2p, a novel RNA-binding protein tethers *ASH1* mRNA to the Myo4p myosin motor via She3p. *EMBO J* **19**: 5514-5524
- Böhmer M, Colby T, Böhmer C, Brautigam A, Schmidt J, Bolker M (2007) Proteomic analysis of dimorphic transition in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Proteomics* **7**: 675-685
- Bölker M (2001) *Ustilago maydis* -- a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence. *Microbiology* **147**: 1395-1401
- Bölker M, Genin S, Lehmmler C, Kahmann R (1995) Genetic regulation of mating, and dimorphism in *Ustilago maydis*. *Can J Bot* **73**: 320-325
- Bölker M, Urban M, Kahmann R (1992) The *a* mating type locus of *Ustilago maydis* specifies cell signaling components. *Cell* **68**: 441-450
- Bortfeld M, Auffarth K, Kahmann R, Basse CW (2004) The *Ustilago maydis a2* mating-type locus genes *lga2* and *rga2* compromise pathogenicity in the absence of the mitochondrial p32 family protein Mrb1. *Plant Cell* **16**: 2233-2248
- Brachmann A, König J, Julius C, Feldbrügge M (2004) A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **272**: 216-226
- Brachmann A, Weinzierl G, Kämper J, Kahmann R (2001) Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. *Mol Microbiol* **42**: 1047-1063.
- Brefort T, Doehlemann G, Mendoza-Mendoza A, Reissmann S, Djamei A, Kahmann R (2009) *Ustilago maydis* as a Pathogen. *Annu Rev Phytopathol* **47**: 423-445
- Brendza RP, Serbus LR, Saxton WM, Duffy JB (2002) Posterior localization of dynein and dorsal-ventral axis formation depend on kinesin in *Drosophila* oocytes. *Curr Biol* **12**: 1541-1545
- Bullock SL, Nicol A, Gross SP, Zicha D (2006) Guidance of bidirectional motor complexes by mRNA cargoes through control of dynein number and activity. *Curr Biol* **16**: 1447-1452
- Cadenas E, Boveris A, Ragan CI, Stoppani AO (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **180**: 248-257
- Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (2002) A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 7877-7882
- Carbajo RJ, Kellas FA, Runswick MJ, Montgomery MG, Walker JE, Neuhaus D (2005) Structure of the F1-binding domain of the stator of bovine F1Fo-ATPase and how it binds an alpha-subunit. *J Mol Biol* **351**: 824-838
- Catic A, Ploegh HL (2005) Ubiquitin--conserved protein or selfish gene? *Trends Biochem Sci* **30**: 600-604
- Chartrand P, Meng XH, Hüttelmaier S, Donato D, Singer RH (2002) Asymmetric sorting of *ash1p* in yeast results from inhibition of translation by localization elements in the mRNA. *Mol Cell* **10**: 1319-1330

- Chartrand P, Singer RH, Long RM (2001) RNP localization and transport in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 297-310
- Chiocchetti A, Gibello L, Carando A, Aspesi A, Secco P, Garelli E, Loreni F, Angelini M, Biava A, Dahl N, Dianzani U, Ramenghi U, Santoro C, Dianzani I (2005) Interactions between RPS19, mutated in Diamond-Blackfan anemia, and the PIM-1 oncoprotein. *Haematologica* **90**: 1453-1462
- Choesmel V, Bacqueville D, Rouquette J, Noaillac-Depeyre J, Fribourg S, Cretien A, Leblanc T, Tchernia G, Da Costa L, Gleizes PE (2007) Impaired ribosome biogenesis in Diamond-Blackfan anemia. *Blood* **109**: 1275-1283
- Christensen JJ (1963) Corn smut caused by *Ustilago maydis*. Published by the American Phytopathological Society, Monograph no **2**: 1-40
- Cino M, Del Maestro RF (1989) Generation of hydrogen peroxide by brain mitochondria: the effect of reoxygenation following postdecapitative ischemia. *Arch Biochem Biophys* **269**: 623-638
- Clark I, Giniger E, Ruohola-Baker H, Jan LY, Jan YN (1994) Transient posterior localization of a kinesin fusion protein reflects anteroposterior polarity of the Drosophila oocyte. *Curr Biol* **4**: 289-300
- Cohen SN, Chang AC, Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**: 2110-2114
- Condeelis J, Singer RH (2005) How and why does beta-actin mRNA target? *Biol Cell* **97**: 97-110
- Corral-Debrinski M, Blugeon C, Jacq C (2000) In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of *ATM1* is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria. *Mol Cell Biol* **20**: 7881-7892
- Cross RL, Muller V (2004) The evolution of A-, F-, and V-type ATP synthases and ATPases: reversals in function and changes in the H⁺/ATP coupling ratio. *FEBS Lett* **576**: 1-4
- Daigle N, Ellenberg J (2007) LambdaN-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging. *Nat Methods* **4**: 633-636
- Denman RB (2006) mRNPs take shape by CLIPPING and PAIRING. *Bioessays* **28**: 1132-1143
- Döhlemann G, van der Linde K, Assmann D, Schwammbach D, Hof A, Mohanty A, Jackson D, Kahmann R (2009) Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells. *PLoS Pathog* **5**: e1000290
- Döhlemann G, Wahl R, Horst RJ, Voll LM, Usadel B, Poree F, Stitt M, Pons-Kühnemann J, Sonnewald U, Kahmann R, Kamper J (2008a) Reprogramming a maize plant: transcriptional and metabolic changes induced by the fungal biotroph *Ustilago maydis*. *Plant J* **56**: 181-195
- Döhlemann G, Wahl R, Vranes M, de Vries RP, Kamper J, Kahmann R (2008b) Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol* **165**: 29-40
- Döhlemann G, Wahl R, Vranes M, de Vries RP, Kämper J, Kahmann R (2008c) Establishment of compatibility in the *Ustilago maydis*/maize pathosystem. *J Plant Physiol* **165**: 29-40
- Draptchinskaia N, Gustavsson P, Andersson B, Pettersson M, Willig TN, Dianzani I, Ball S, Tchernia G, Klar J, Matsson H, Tentler D, Mohandas N, Carlsson B, Dahl N (1999) The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nat Genet* **21**: 169-175
- Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N (2002) Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**: 195-205
- Droge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* **82**: 47-95

- Du TG, Schmid M, Jansen RP (2007) Why cells move messages: the biological functions of mRNA localization. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 171-177
- Dünkler A, Walther A, Specht CA, Wendland J (2005) *Candida albicans* CHT3 encodes the functional homolog of the Cts1 chitinase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol* **42**: 935-947
- Eliyahu E, Pnueli L, Melamed D, Scherrer T, Gerber AP, Pines O, Rapaport D, Arava Y (2010) Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-dependent manner. *Mol Cell Biol* **30**: 284-294
- Elson SL, Noble SM, Solis NV, Filler SG, Johnson AD (2009) An RNA transport system in *Candida albicans* regulates hyphal morphology and invasive growth. *PLoS Genet* **5**: e1000664
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* **2**: 953-971
- Enyenihi AH, Saunders WS (2003) Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**: 47-54
- Estrada P, Kim J, Coleman J, Walker L, Dunn B, Takizawa P, Novick P, Ferro-Novick S (2003) Myo4p and She3p are required for cortical ER inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **163**: 1255-1266
- Feldbrügge M, Bölker M, Steinberg G, Kämper J, Kahmann R (2006) Regulatory and structural networks orchestrating mating, dimorphism, cell shape, and pathogenesis in *Ustilago maydis*. In *The Mycota: growth, differentiation and sexuality*, Fischer R, Kües U (eds), Vol. 2, pp 376-391. Springer, Berlin Heidelberg
- Feldbrügge M, Kämper J, Steinberg G, Kahmann R (2004) Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr Opin Microbiol* **7**: 666-672
- Feldbrügge M, Zarnack K, Vollmeister E, Baumann S, Koepke J, König J, Munsterkotter M, Mannhaupt G (2008) The posttranscriptional machinery of *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**: S40-46
- Finley D, Bartel B, Varshavsky A (1989) The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* **338**: 394-401
- Fischer R, Zekert N, Takeshita N (2008) Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol Microbiol* **68**: 813-826
- Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, Miyake K, Caffrey JM, Karlsson S, Ellis SR (2007) Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood* **109**: 980-986
- Flygare J, Karlsson S (2007) Diamond-Blackfan anemia: erythropoiesis lost in translation. *Blood* **109**: 3152-3154
- Fuchs U, Manns I, Steinberg G (2005) Microtubules are dispensable for the initial pathogenic development but required for long-distance hyphal growth in the corn smut fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**: 2746-2758
- Fusco D, Accornero N, Lavoie B, Shenoy SM, Blanchard JM, Singer RH, Bertrand E (2003) Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr Biol* **13**: 161-167
- Gade D, Thiermann J, Markowsky D, Rabus R (2003) Evaluation of two-dimensional difference gel electrophoresis for protein profiling. Soluble proteins of the marine bacterium *Pirellula* sp. strain 1. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**: 240-251
- Garcia M, Darzacq X, Delaveau T, Jourdain L, Singer RH, Jacq C (2007) Mitochondria-associated yeast mRNAs and the biogenesis of molecular complexes. *Mol Biol Cell* **18**: 362-368

- Garcia M, Delaveau T, Goussard S, Jacq C (2010) Mitochondrial presequence and open reading frame mediate asymmetric localization of messenger RNA. *EMBO Rep* **11**: 285-291
- Gazda HT, Sheen MR, Vlachos A, Choesmel V, O'Donohue MF, Schneider H, Darras N, Hasman C, Sieff CA, Newburger PE, Ball SE, Niewiadomska E, Matysiak M, Zaucha JM, Glader B, Niemeyer C, Meerpohl JJ, Atsidaftos E, Lipton JM, Gleizes PE, Beggs AH (2008) Ribosomal protein L5 and L11 mutations are associated with cleft palate and abnormal thumbs in Diamond-Blackfan anemia patients. *Am J Hum Genet* **83**: 769-780
- George R, Walsh P, Beddoe T, Lithgow T (2002) The nascent polypeptide-associated complex (NAC) promotes interaction of ribosomes with the mitochondrial surface in vivo. *FEBS Lett* **516**: 213-216
- Gierz G, Bartnicki-Garcia S (2001) A three-dimensional model of fungal morphogenesis based on the vesicle supply center concept. *J Theor Biol* **208**: 151-164
- Gillissen B, Bergemann J, Sandmann C, Schroeer B, Bölker M, Kahmann R (1992) A two-component regulatory system for self/non-self recognition in *Ustilago maydis*. *Cell* **68**: 647-657
- Gregory LA, Aguisa-Toure AH, Pinaud N, Legrand P, Gleizes PE, Fribourg S (2007) Molecular basis of Diamond-Blackfan anemia: structure and function analysis of RPS19. *Nucleic Acids Res* **35**: 5913-5921
- Grivennikova VG, Vinogradov AD (2006) Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 553-561
- Gu W, Deng Y, Zenklusen D, Singer RH (2004) A new yeast PUF family protein, Puf6p, represses ASH1 mRNA translation and is required for its localization. *Genes Dev* **18**: 1452-1465
- Haarer B, Viggiano S, Hibbs MA, Troyanskaya OG, Amberg DC (2007) Modeling complex genetic interactions in a simple eukaryotic genome: actin displays a rich spectrum of complex haploinsufficiencies. *Genes Dev* **21**: 148-159
- Hachet O, Ephrussi A (2001) Drosophila Y14 shuttles to the posterior of the oocyte and is required for oskar mRNA transport. *Curr Biol* **11**: 1666-1674
- Hachet O, Ephrussi A (2004) Splicing of oskar RNA in the nucleus is coupled to its cytoplasmic localization. *Nature* **428**: 959-963
- Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V (1997) Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr* **29**: 89-95
- Harris SD (2006) Cell polarity in filamentous fungi: shaping the mold. *Int Rev Cytol* **251**: 41-77
- Harris SD, Read ND, Roberson RW, Shaw B, Seiler S, Plamann M, Momany M (2005) Polarisome meets Spitzenkörper: microscopy, genetics, and genomics converge. *Eukaryot Cell* **4**: 225-229
- Heimel K, Scherer M, Vranes M, Wahl R, Pothiratana C, Schuler D, Vincon V, Finkernagel F, Flor-Parra I, Kamper J (2010) The transcription factor Rbf1 is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathog* **6**
- Henrissat B, Bairoch A (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* **293** (Pt 3): 781-788
- Hirokawa N, Noda Y (2008) Intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: structure, function, and dynamics. *Physiol Rev* **88**: 1089-1118
- Hirst J (2010) Towards the molecular mechanism of respiratory complex I. *Biochem J* **425**: 327-339
- Hirst J, King MS, Pryde KR (2008) The production of reactive oxygen species by complex I. *Biochem Soc Trans* **36**: 976-980

- Hogan DJ, Riordan DP, Gerber AP, Herschlag D, Brown PO (2008) Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biol* **6**: e255
- Holliday R (1974) *Ustilago maydis*. In *Handbook of Genetics*, King RC (ed), Vol. 1, pp 575-595. New York, USA: Plenum Press
- Holliday R (2004) Early studies on recombination and DNA repair in *Ustilago maydis*. *DNA Repair (Amst)* **3**: 671-682
- Holt CE, Bullock SL (2009) Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters. *Science* **326**: 1212-1216
- Howard RJ (1981) Ultrastructural analysis of hyphal tip cell growth in fungi: Spitzenkörper, cytoskeleton and endomembranes after freeze-substitution. *J Cell Sci* **48**: 89-103
- Hüttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dictenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH (2005) Spatial regulation of *beta-actin* translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**: 512-515
- Huynh JR, Munro TP, Smith-Litiere K, Lepesant JA, St Johnston D (2004) The *Drosophila* hnRNPA/B homolog, Hrp48, is specifically required for a distinct step in *osk* mRNA localization. *Dev Cell* **6**: 625-635
- Jambhekar A, DeRisi JL (2007) *Cis*-acting determinants of asymmetric, cytoplasmic RNA transport. *RNA* **13**: 625-642
- Jansen RP (2001) mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**: 247-256
- Jansen RP, Dowzer C, Michaelis C, Galova M, Nasmyth K (1996) Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins. *Cell* **84**: 687-697
- Jaques AK, Fukamizo T, Hall D, Barton RC, Escott GM, Parkinson T, Hitchcock CA, Adams DJ (2003) Disruption of the gene encoding the ChiB1 chitinase of *Aspergillus fumigatus* and characterization of a recombinant gene product. *Microbiology* **149**: 2931-2939
- Jenny A, Hachet O, Zavorszky P, Cyrklaff A, Weston MD, Johnston DS, Erdelyi M, Ephrussi A (2006) A translation-independent role of oskar RNA in early *Drosophila* oogenesis. *Development* **133**: 2827-2833
- Johnstone O, Lasko P (2001) Translational regulation and RNA localization in *Drosophila* oocytes and embryos. *Annu Rev Genet* **35**: 365-406
- Kahmann R, Kämper J (2004) *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. *New Phytologist* **164**: 31-42
- Kahmann R, Steinberg G, Basse C, Kämper J (2000) *Ustilago maydis*, the causative agent of corn smut disease. In *Fungal Pathology*, Kronstad JW (ed), pp 347-371. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers
- Kämper J (2004) A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics* **271**: 103-110
- Kämper J, Kahmann R, Bölker M, Ma LJ, Brefort T, Saville BJ, Banuett F, Kronstad JW, Gold SE, Müller O, Perlin MH, Wösten HA, de Vries R, Ruiz-Herrera J, Reynaga-Peña CG, Snetselaar K, McCann M, Pérez-Martín J, Feldbrügge M, Basse CW, Steinberg G, Ibeas JI, Holloman W, Guzman P, Farman M, Stajich JE, Sentandreu R, González-Prieto JM, Kennell JC, Molina L, Schirawski J, Mendoza-Mendoza A, Greilinger D, Munch K, Rossel N, Scherer M, Vraneš M, Ladendorf O, Vincon V, Fuchs U, Sandrock B, Meng S, Ho EC, Cahill MJ, Boyce KJ, Klose J, Klosterman SJ, Deelstra HJ, Ortiz-Castellanos L, Li W, Sanchez-Alonso P, Schreier PH, Häuser-Hahn I, Vaupel M, Koopmann E, Friedrich G, Voss H,

- Schlüter T, Margolis J, Platt D, Swimmer C, Gnirke A, Chen F, Vysotskaia V, Mannhaupt G, Güldener U, Münsterkötter M, Haase D, Oesterheld M, Mewes HW, Mauceli EW, DeCaprio D, Wade CM, Butler J, Young S, Jaffe DB, Calvo S, Nusbaum C, Galagan J, Birren BW (2006) Insights from the genome of the biotrophic fungal plant pathogen *Ustilago maydis*. *Nature* **444**: 97-101
- Kämper J, Reichmann M, Romeis T, Bölker M, Kahmann R (1995) Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE and bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. *Cell* **81**: 73-83
- Kasprzewska A (2003) Plant chitinases--regulation and function. *Cell Mol Biol Lett* **8**: 809-824
- Kellis M, Birren BW, Lander ES (2004) Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**: 617-624
- Kislauskis EH, Li Z, Singer RH, Taneja KL (1993) Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *J Cell Biol* **123**: 165-172
- Komili S, Farny NG, Roth FP, Silver PA (2007) Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell* **131**: 557-571
- König J, Baumann S, Koepke J, Pohlmann T, Zarnack K, Feldbrügge M (2009) The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-distance transport of ubi1 and rho3 mRNAs. *EMBO J* **28**: 1855-1866
- Koppen M, Metodiev MD, Casari G, Rugarli EI, Langer T (2007) Variable and tissue-specific subunit composition of mitochondrial m-AAA protease complexes linked to hereditary spastic paraplegia. *Mol Cell Biol* **27**: 758-767
- Korbel D, Wurth S, Kaser M, Langer T (2004) Membrane protein turnover by the m-AAA protease in mitochondria depends on the transmembrane domains of its subunits. *EMBO Rep* **5**: 698-703
- Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* **416**: 15-18
- Kozlov G, De Crescenzo G, Lim NS, Siddiqui N, Fantus D, Kahvejian A, Trempe JF, Elias D, Ekiel I, Sonenberg N, O'Connor-McCourt M, Gehring K (2004) Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase. *EMBO J* **23**: 272-281
- Kozlov G, Menade M, Rosenauer A, Nguyen L, Gehring K (2010) Molecular determinants of PAM2 recognition by the MLLE domain of poly(A)-binding protein. *J Mol Biol* **397**: 397-407
- Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS (2004) Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* **279**: 4127-4135
- Kuranda MJ, Robbins PW (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**: 19758-19767
- Kussmaul L, Hirst J (2006) The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 7607-7612
- Lambert AJ, Brand MD (2004) Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem J* **382**: 511-517
- Lecuyer E, Yoshida H, Parthasarathy N, Alm C, Babak T, Cerovina T, Hughes TR, Tomancak P, Krause HM (2007) Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell* **131**: 174-187
- Leger-Silvestre I, Caffrey JM, Dawaliby R, Alvarez-Arias DA, Gas N, Bertolone SJ, Gleizes PE, Ellis SR (2005) Specific Role for Yeast Homologs of the Diamond Blackfan Anemia-associated Rps19 Protein in Ribosome Synthesis. *J Biol Chem* **280**: 38177-38185

- Lehmler C, Steinberg G, Snetselaar KM, Schliwa M, Kahmann R, Bölker M (1997) Identification of a motor protein required for filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J* **16**: 3464-3473
- Letunic I, Copley RR, Schmidt S, Ciccarelli FD, Doerks T, Schultz J, Ponting CP, Bork P (2004) SMART 4.0: towards genomic data integration. *Nucleic Acids Res* **32**: D142-144
- Letunic I, Doerks T, Bork P (2009) SMART 6: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* **37**: D229-232
- Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M (2004) The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* **119**: 873-887
- Lin AC, Holt CE (2007) Local translation and directional steering in axons. *EMBO J* **26**: 3729-3736
- Long RM, Gu W, Lorimer E, Singer RH, Chartrand P (2000) She2p is a novel RNA-binding protein that recruits the Myo4p-She3p complex to *ASH1* mRNA. *EMBO J* **19**: 6592-6601
- Long RM, Singer RH, Meng X, Gonzalez I, Nasmyth K, Jansen RP (1997) Mating type switching in yeast controlled by asymmetric localization of *ASH1* mRNA. *Science* **277**: 383-387
- Lutsch G, Stahl J, Kargel HJ, Noll F, Bielka H (1990) Immunoelectron microscopic studies on the location of ribosomal proteins on the surface of the 40S ribosomal subunit from rat liver. *Eur J Cell Biol* **51**: 140-150
- MacKenzie JA, Payne RM (2007) Mitochondrial protein import and human health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 509-523
- Mahlert M, Vogler C, Stelter K, Hause G, Basse CW (2009) The $\alpha 2$ mating-type-locus gene *lga2* of *Ustilago maydis* interferes with mitochondrial dynamics and fusion, partially in dependence on a Dnm1-like fission component. *J Cell Sci* **122**: 2402-2412
- Marc P, Margeot A, Devaux F, Blugeon C, Corral-Debrinski M, Jacq C (2002) Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep* **3**: 159-164
- Margeot A, Blugeon C, Sylvestre J, Vialette S, Jacq C, Corral-Debrinski M (2002) In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *EMBO J* **21**: 6893-6904
- Maris C, Dominguez C, Allain FH (2005) The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *Febs J* **272**: 2118-2131
- Martin KC, Ephrussi A (2009) mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**: 719-730
- Martin SG, Leclerc V, Smith-Litiere K, St Johnston D (2003) The identification of novel genes required for *Drosophila* anteroposterior axis formation in a germline clone screen using GFP-Staufen. *Development* **130**: 4201-4215
- Mazumder B, Sampath P, Seshadri V, Maitra RK, DiCorleto PE, Fox PL (2003) Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. *Cell* **115**: 187-198
- Micklem DR, Adams J, Grunert S, St Johnston D (2000) Distinct roles of two conserved Staufen domains in oskar mRNA localization and translation. *EMBO J* **19**: 1366-1377
- Moore MJ (2005) From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs. *Science* **309**: 1514-1518
- Mueller O, Kahmann R, Aguilar G, Trejo-Aguilar B, Wu A, de Vries RP (2008) The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol* **45 Suppl 1**: S63-70

- Müller M, Heuck A, Niessing D (2007) Directional mRNA transport in eukaryotes: lessons from yeast. *Cell Mol Life Sci* **64**: 171-180
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* **417**: 1-13
- Nelson C, Goto S, Lund K, Hung W, Sadowski I (2003) Srb10/Cdk8 regulates yeast filamentous growth by phosphorylating the transcription factor Ste12. *Nature* **421**: 187-190
- Neupert W (1997) Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **66**: 863-917
- Neupert W, Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**: 723-749
- Ni L, Snyder M (2001) A genomic study of the bipolar bud site selection pattern in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **12**: 2147-2170
- Nickel W (2010) Pathways of unconventional protein secretion. *Curr Opin Biotechnol* **21**: 621-626
- Nickel W, Rabouille C (2009) Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 148-155
- Niessing D, Huttelmaier S, Zenklusen D, Singer RH, Burley SK (2004) She2p is a novel RNA binding protein with a basic helical hairpin motif. *Cell* **119**: 491-502
- Nishiura H, Tanase S, Shibuya Y, Futa N, Sakamoto T, Higginbottom A, Monk P, Zwirner J, Yamamoto T (2005) S19 ribosomal protein dimer augments metal-induced apoptosis in a mouse fibroblastic cell line by ligation of the C5a receptor. *J Cell Biochem* **94**: 540-553
- Oeffinger M, Wei KE, Rogers R, DeGrasse JA, Chait BT, Aitchison JD, Rout MP (2007) Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nat Methods* **4**: 951-956
- Palacios IM, Gatfield D, St Johnston D, Izaurralde E (2004) An eIF4AIII-containing complex required for mRNA localization and nonsense-mediated mRNA decay. *Nature* **427**: 753-757
- Palacios IM, St Johnston D (2002) Kinesin light chain-independent function of the Kinesin heavy chain in cytoplasmic streaming and posterior localisation in the *Drosophila* oocyte. *Development* **129**: 5473-5485
- Paquin N, Chartrand P (2008) Local regulation of mRNA translation: new insights from the bud. *Trends Cell Biol* **18**: 105-111
- Paquin N, Menade M, Poirier G, Donato D, Drouet E, Chartrand P (2007) Local activation of yeast ASH1 mRNA translation through phosphorylation of Khd1p by the casein kinase Yck1p. *Mol Cell* **26**: 795-809
- Rappas M, Niwa H, Zhang X (2004) Mechanisms of ATPases--a multi-disciplinary approach. *Curr Protein Pept Sci* **5**: 89-105
- Ray PS, Arif A, Fox PL (2007) Macromolecular complexes as depots for releasable regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* **32**: 158-164
- Reichard U, Hung CY, Thomas PW, Cole GT (2000) Disruption of the gene which encodes a serodiagnostic antigen and chitinase of the human fungal pathogen *Coccidioides immitis*. *Infect Immun* **68**: 5830-5838
- Reineke G, Heinze B, Schirawski J, Buettner H, Kahmann R, Basse CW (2008) Indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis in the smut fungus *Ustilago maydis* and its relevance for increased IAA levels in infected tissue and host tumour formation. *Mol Plant Pathol* **9**: 339-355

- Requena N, Alberti-Segui C, Winzenburg E, Horn C, Schliwa M, Philippsen P, Liese R, Fischer R (2001) Genetic evidence for a microtubule-destabilizing effect of conventional kinesin and analysis of its consequences for the control of nuclear distribution in *Aspergillus nidulans*. *Mol Microbiol* **42**: 121-132
- Riechmann V, Ephrussi A (2001) Axis formation during *Drosophila* oogenesis. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 374-383
- Riquelme M, Bartnicki-Garcia S, Gonzalez-Prieto JM, Sanchez-Leon E, Verdin-Ramos JA, Beltran-Aguilar A, Freitag M (2007) Spitzenkorper localization and intracellular traffic of green fluorescent protein-labeled CHS-3 and CHS-6 chitin synthases in living hyphae of *Neurospora crassa*. *Eukaryot Cell* **6**: 1853-1864
- Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM, Murphy MP, Beckman JS (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 15038-15043
- Rodriguez AJ, Czaplinski K, Condeelis JS, Singer RH (2008) Mechanisms and cellular roles of local protein synthesis in mammalian cells. *Curr Opin Cell Biol* **20**: 144-149
- Rodriguez AJ, Shenoy SM, Singer RH, Condeelis J (2006) Visualization of mRNA translation in living cells. *J Cell Biol* **175**: 67-76
- Ross AF, Oleynikov Y, Kislauskis EH, Taneja KL, Singer RH (1997) Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol* **17**: 2158-2165
- Saint-Georges Y, Garcia M, Delaveau T, Jourden L, Le Crom S, Lemoine S, Tanty V, Devaux F, Jacq C (2008) Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PLoS One* **3**: e2293
- Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour, New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Schmid M, Jaedicke A, Du TG, Jansen RP (2006) Coordination of endoplasmic reticulum and mRNA localization to the yeast bud. *Curr Biol* **16**: 1538-1543
- Schuchardt I, Assmann D, Thines E, Schuberth C, Steinberg G (2005) Myosin-V, Kinesin-1, and Kinesin-3 cooperate in hyphal growth of the fungus *Ustilago maydis*. *Mol Biol Cell* **16**: 5191-5201
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 5857-5864
- Schulz B, Banuett F, Dahl M, Schlesinger R, Schäfer W, Martin T, Herskowitz I, Kahmann R (1990) The *b* alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* **60**: 295-306
- Schuster J, Frojmark AS, Nilsson P, Badhai J, Virtanen A, Dahl N (2010) Ribosomal protein S19 binds to its own mRNA with reduced affinity in Diamond-Blackfan anemia. *Blood Cells Mol Dis* **45**: 23-28
- Seidl V, Huemer B, Seiboth B, Kubicek CP (2005) A complete survey of Trichoderma chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. *FEBS J* **272**: 5923-5939
- Seiler S, Nargang FE, Steinberg G, Schliwa M (1997) Kinesin is essential for cell morphogenesis and polarized secretion in *Neurospora crassa*. *EMBO J* **16**: 3025-3034
- Sharpless KE, Harris SD (2002) Functional characterization and localization of the *Aspergillus nidulans* formin SEPA. *Mol Biol Cell* **13**: 469-479
- Shepard KA, Gerber AP, Jambhekar A, Takizawa PA, Brown PO, Herschlag D, DeRisi JL, Vale RD (2003) Widespread cytoplasmic mRNA transport in yeast: identification of 22 bud-localized transcripts using DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 11429-11434

- Shestakova EA, Singer RH, Condeelis J (2001) The physiological significance of beta -actin mRNA localization in determining cell polarity and directional motility. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 7045-7050
- Snetselaar KM (1993) Microscopic observation of *Ustilago maydis* mating interactions. *Exp Mycol* **17**: 345-355
- Snetselaar KM, Mims CW (1992) Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia* **84**: 193-203
- Snetselaar KM, Mims CW (1993) Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: Light and electron microscopy. *Phytopathology* **83**: 843
- Snetselaar KM, Mims CW (1994) Light and electron microscopy of *Ustilago maydis* hyphae in maize. *Mycol Res* **98**: 347-355
- Soulet F, Al Saati T, Roga S, Amalric F, Bouche G (2001) Fibroblast growth factor-2 interacts with free ribosomal protein S19. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: 591-596
- Spellig T, Bottin A, Kahmann R (1996) Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol Gen Genet* **252**: 503-509
- St Johnston D (2005) Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 363-375
- St Johnston D, Beuchle D, Nusslein-Volhard C (1991) Staufén, a gene required to localize maternal RNAs in the Drosophila egg. *Cell* **66**: 51-63
- Steinberg G (2007) Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkörper. *Eukaryot Cell* **6**: 351-360
- Steinberg G, Schliwa M, Lehmler C, Bölker M, Kahmann R, McIntosh JR (1998) Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *J Cell Sci* **111**: 2235-2246
- Steinhauer J, Kalderon D (2006) Microtubule polarity and axis formation in the Drosophila oocyte. *Dev Dyn* **235**: 1455-1468
- Sylvestre J, Vialette S, Corral Debrinski M, Jacq C (2003) Long mRNAs coding for yeast mitochondrial proteins of prokaryotic origin preferentially localize to the vicinity of mitochondria. *Genome Biol* **4**: R44
- Taib M, Pinney JW, Westhead DR, McDowall KJ, Adams DJ (2005) Differential expression and extent of fungal/plant and fungal/bacterial chitinases of *Aspergillus fumigatus*. *Arch Microbiol* **184**: 78-81
- Takizawa PA, Sil A, Swedlow JR, Herskowitz I, Vale RD (1997) Actin-dependent localization of an RNA encoding a cell-fate determinant in yeast. *Nature* **389**: 90-93
- Tange TO, Nott A, Moore MJ (2004) The ever-increasing complexities of the exon junction complex. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 279-284
- Tatsuta T, Langer T (2008) Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J* **27**: 306-314
- Tekotte H, Davis I (2002) Intracellular mRNA localization: motors move messages. *Trends Genet* **18**: 636-642
- Tsukuda T, Carleton S, Fotheringham S, Holloman WK (1988) Isolation and characterization of an autonomously replicating sequence from *Ustilago maydis*. *Mol Cell Biol* **8**: 3703-3709

- Ule J, Jensen K, Mele A, Darnell RB (2005) CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods* **37**: 376-386
- Ule J, Jensen KB, Ruggiu M, Mele A, Ule A, Darnell RB (2003) CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* **302**: 1212-1215
- Unlü M, Morgan ME, Minden JS (1997) Difference gel electrophoresis: a single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* **18**: 2071-2077
- Vale RD (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**: 467-480
- Voos W, Rottgers K (2002) Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1592**: 51-62
- Votyakova TV, Reynolds IJ (2001) DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* **79**: 266-277
- Wang SL, Chang WT (1997) Purification and characterization of two bifunctional chitinases/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Appl Environ Microbiol* **63**: 380-386
- Wedlich-Söldner R, Bölker M, Kahmann R, Steinberg G (2000) A putative endosomal t-SNARE links exo- and endocytosis in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *EMBO J* **19**: 1974-1986.
- Westermeier R, Scheibe B (2008) Difference gel electrophoresis based on lys/cys tagging. *Methods Mol Biol* **424**: 73-85
- Wiedemann N, Frazier AE, Pfanner N (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* **279**: 14473-14476
- Yaffe MP (1991) Analysis of mitochondrial function and assembly. *Methods Enzymol* **194**: 627-643
- Yamazaki H, Tanaka A, Kaneko J, Ohta A, Horiuchi H (2008) *Aspergillus nidulans* ChiA is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored chitinase specifically localized at polarized growth sites. *Fungal Genet Biol* **45**: 963-972
- Yasuda R, Noji H, Yoshida M, Kinosita K, Jr., Itoh H (2001) Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase. *Nature* **410**: 898-904
- Zarnack K, Feldbrugge M (2010) Microtubule-dependent mRNA transport in fungi. *Eukaryot Cell* **9**: 982-990
- Zarnack K, Feldbrügge M (2007) mRNA trafficking in fungi. *Mol Genet Genomics*
- Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B (2005) Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 5727-5732
- Zielonka J, Srinivasan S, Hardy M, Ouari O, Lopez M, Vasquez-Vivar J, Avadhani NG, Kalyanaraman B (2008a) Cytochrome c-mediated oxidation of hydroethidine and mito-hydroethidine in mitochondria: identification of homo- and heterodimers. *Free Radic Biol Med* **44**: 835-846
- Zielonka J, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B (2008b) Detection of 2-hydroxyethidium in cellular systems: a unique marker product of superoxide and hydroethidine. *Nat Protoc* **3**: 8-21
- Zimyanin VL, Belaya K, Pecreaux J, Gilchrist MJ, Clark A, Davis I, St Johnston D (2008) In vivo imaging of oskar mRNA transport reveals the mechanism of posterior localization. *Cell* **134**: 843-853

6 Anhang

6.1 Anhang Tabelle A1: Identifizierung von Proteinen mit LC-MS/MS

Nr.	Gen	vorhergesagte Genfunktion	UM Nummer ^a	Score	Sf (pro)	Sequenz- abdeckung (%)	MW (Da)	pI	Peptides	MH+	z	XCorr	Sf(pep)	Delta Cn
1	<i>rps19b</i>	Ribosomal protein S19	um11551	70,25	7,73	36,5	17784	5,07	IEVPTWVDIVK VVQGLEGIGVLEK EQAPYNPWFYVR DVDASTFIDAYAQHLK	1299,54 1341,58 1685,82 1794,94	2 2 2 2	3,28 4,48 2,87 5,07	0,93 0,98 0,93 0,98	0,36 0,54 0,47 0,63
2	<i>cts1</i>	Chitinase	um10419	120,30	11,44	33,1	54884	8,20	LVLGIPLYGR IAASWSYDSAK SSSSASSLPPSPTK GAMFWELSGDATK GFENTDGPQQPYR EFISYDTQPNVLLK GTGQGTWEAGNWDYK VNLAYFTNWGIYGR NM*GTLDATLNHISYPFSK GAPPSADDINYYIGQGVVSHK KNETNPYLLSIAAPCGPDHYK	1101,37 1199,29 1333,43 1413,58 1509,56 1667,88 1670,72 1674,88 2026,26 2276,45 2389,67	2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 3	2,34 3,69 3,60 4,24 2,96 4,54 3,89 3,70 4,68 4,15 5,90	0,91 0,96 0,93 0,98 0,91 0,98 0,95 0,97 0,96 0,95 0,97	0,47 0,54 0,52 0,56 0,37 0,54 0,53 0,55 0,44 0,50 0,47
3	<i>afg3</i>	Protease of the SEC18/ CDC48 / PAS1 family of ATPases	um00898	40,27	3,75	5,2	93846	7,71	AAGGAM*GGGGGGPGGIFGIGK GAILSGPPGTGK EEIM*EFVNFLK	1719,90 1055,21 1415,64	2 2 2	4,93 3,02 2,51	0,98 0,93 0,88	0,67 0,43 0,37
4	<i>cts1</i>	Chitinase	um10419	90,27	8,47	26,2	54884	8,20	LVLGIPLYGR IAASWSYDSAK GAM*FWELSGDATK GFENTDGPQQPYR EFISYDTQPNVLLK GTGQGTWEAGNWDYK VNLAYFTNWGIYGR LM*LSVGGWTFGPHFAPM*AADAK KNETNPYLLSIAAPCGPDHYK	1101,37 1199,29 1429,58 1509,56 1667,88 1670,72 1674,88 2337,71 2389,67	2 2 2 2 2 2 2 3 3	2,50 3,60 4,11 3,30 4,24 3,98 3,51 3,61 5,48	0,90 0,96 0,98 0,94 0,98 0,96 0,94 0,84 0,98	0,46 0,55 0,54 0,44 0,53 0,50 0,47 0,30 0,45
5	n.i. ^b													
6	<i>cts1</i>	Chitinase	um10419	70,27	6,70	19,3	54884	8,20	LVLGIPLYGR IAASWSYDSAK GAM*FWELSGDATK GFENTDGPQQPYR EFISYDTQPNVLLK GTGQGTWEAGNWDYK KNETNPYLLSIAAPCGPDHYK	1101,37 1199,29 1429,58 1509,56 1667,88 1670,72 2389,67	2 2 2 2 2 2 3	2,46 3,37 3,63 3,28 4,22 4,07 5,34	0,92 0,96 0,98 0,94 0,97 0,97 0,97	0,48 0,57 0,55 0,47 0,52 0,54 0,45
7	n.i.													
8	<i>atp4</i>	H ⁺ -transporting two-sector ATPase chain b	um10548	90,27	8,56	48,3	26010	9,82	SVLDSWVR VQDSLNDKQLK DVVGLTQALYSVAK ETAQTEKEVFELR ASSIISLPGNSLVSK QILDNAVAIESLVK TGWVTLGTGLTAVAIK AITGPYKEWADSQIEK ITSVESQKDVVGLTQALYSVAK	962,08 1403,52 1464,66 1580,72 1588,78 1642,88 1675,96 1837,02 2337,66	2 2 2 2 2 3 2 2 2	2,54 3,18 4,43 3,03 4,05 4,21 4,63 4,71 5,36	0,91 0,96 0,98 0,89 0,96 0,96 0,98 0,98 0,98	0,43 0,46 0,48 0,39 0,53 0,51 0,57 0,49 0,60
9	n.i.													
10	<i>nuo2</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase	um11495	50,34	4,72	37,0	18724	6,77	GALGVFTR SNEQVVTETFSER DDAVNGAIGGCAAGFVLGAAAR SVPMM*MGGCCASLAALIGTDAAGK	820,96 1526,58 2034,24 2405,80	2 2 2 3	2,64 3,90 6,71 4,27	0,90 0,96 0,99 0,93	0,41 0,48 0,67 0,50

Die Analyse der Daten wurde mit dem Programmpaket BioWorks 3.2 (Thermo Scientific) mittels des TurboSEQUESTTM Protein-Identifizierungs-Algorithmus ausgeführt. Die Fragment-Ionenspektren wurden gegen die *U. maydis* Protein-Datenbank MUMDB verglichen (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>; Datenbestand vom März 2006; 6892 vorhergesagte Gene; Kämper *et al.*, 2006). Die Identifizierung der Peptide benötigte Xcorr-Werte von mindestens 2,0, 2,3 und 3,5 für die jeweiligen Ladezustände +1, +2 und +3. Angegeben ist der Score und Sf für die Proteine und der Xcorr, Sf(pep) und Delta Cn für die einzelnen Peptide.

6.2 Filme

Die Filme (AVI-Format), auf welche im Text verwiesen wurde liegen auf CD dieser Arbeit bei. Die Filme sind unter der folgenden Bezeichnung zu finden:

Video1: AB33pab1G_Video1

Video2: AB33pab1G_rrm4Δ_Video2

Video3: Kolokalisation_AB33pab1R_rrm4G_Video3

Danksagung

Ein herzlicher Dank gilt Michael für seine hervorragende Betreuung, das spannende Projekt, die vielen Freiräume und zahlreichen Diskussionen. Zusätzlich möchte ich mich auch für seine tatkräftige Unterstützung im letzten Jahr von Düsseldorf aus bedanken. Außerdem möchte ich mich bei Frau Regine Kahmann für die Aufnahme in ihre Abteilung, besonders im letzten Jahr meiner Doktorarbeit, und für jegliche Unterstützung während meiner Zeit am MPI bedanken. Für die freundliche Bereitschaft der Teilnahme an meiner Prüfungskommission danke ich Herrn Thanbichler, Frau Kahmann und Herrn Maier sowie natürlich dem Michael. Darüber hinaus danke ich Martin Thanbichler für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ein ganz besonderer und riesengroßer Dank gilt den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des STaR (RAB)-Labs. Es war eine richtig tolle Zeit mit Euch!!! Im Speziellen möchte ich mich bei Julian, Sebastian und Thomas für die gute Zusammenarbeit an dem Rrm4-Projekt und für jegliche Unterstützung bedanken. Bei Petra möchte ich mich besonders für ihre zuverlässige Hilfe, für die Herstellung zahlreicher Stämme und natürlich für unseren gemeinsamen leckeren Lunch inklusive der STaR-Lab- Tradition, dem Obstsalat, bedanken. Auch Evelyn, Kathi und Carl möchte ich für Diskussionen, Ratschläge, Korrekturen, Gift-Hilfen und sonstigen Ebenen der Schwangerschafts-und Doktoranden-Betreuung danken. Dem Florian möchte ich für die massenspektrometrischen Analysen, zahlreichen Diskussionen und Hilfestellung im Protein-Alltag danken. Des Weiteren möchte ich mich bei Ronny Kellner und Dominik Begerow von der Ruhr-Universität Bochum für die gute Zusammenarbeit bedanken.

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mich in den letzten Jahren am MPI begleitet und unterstützt haben. Besonders gilt dass für die Truppe, mit der ich meine Zeit vor der Institutstür verbracht habe, von denen ich immer den neusten Klatsch und Tratsch erfahren habe und bei denen ich immer Dampf ablassen durfte. Der lieben Ria für ihre reinliche Arbeit, mütterlichen Ratschläge und lustige Mittagspausen.

Den Kämpfer-Boys Ramon, Kai und Miro danke ich für die supertolle gemeinsame Zeit am Institut und auch in der Kneipe. Des Weiteren möchte ich mich bei den neuen B2-Leuten, besonders bei der AG Döhlemann und AG Stukenbrock, für die Unterstützung und Integration während der Arbeitsgruppen-losen Endphase meiner Doktorarbeit bedanken.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Freunden und meiner Familie für ihre immer währende Aufmunterung, jede Form von Unterstützung, emotionalem Beistand und Rückenstärkung bedanken. Dabei gilt ein außerordentlicher Dank meiner Mama, meinem Freund und meiner Schwester, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Meiner süßen Tochter Maya danke ich für viele wundervolle Momente und der Erkenntnis, im richtigen Augenblick die richtige Entscheidung getroffen zu haben.

Lebenslauf

Janine Koepke

geboren am 26. Mai 1978 in Lich

Schulbildung

1984 bis

1988 bis 1994

Besuch des Gymnasiums in Laubach

1994 bis 1997

Besuch des Laubach Kollegs
Abschluss mit Abitur

Berufsausbildung

10/ 1997 – 09/ 2000

Ausbildung zur medizinisch-technischen
Laboratoriumsassistentin am Klinikum der
Justus-Liebig-Universität Gießen
Abschluss: staatliche Prüfung zur
medizinisch-technischen Laboratoriumsassistentin

Studium

10/ 2000 – 09/ 2005

Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg
Hauptfächer: Genetik, Parasitologie und Zellbiologie

11/ 2004 – 10/ 2005

Diplomarbeit
Abteilung für Organismische Interaktionen von Prof. Dr. Regine Kahmann
Max Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg
Arbeitsgruppe von Dr. Michael Feldbrügge /
Titel: Proteomvergleich zur Charakterisierung des RNA-bindenden Proteins
Rrm4 in *Ustilago maydis*

Promotion

11/ 2005 -11/2010

Abteilung für Organismische Interaktionen von Prof. Dr. Regine Kahmann
Max Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Marburg
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Feldbrügge
Titel: Die Rolle des RNA-bindenden Proteins Rrm4 während des polaren
Wachstums von *Ustilago maydis*

Publikationen

November 2010

J. Koepke, F. Kaffarnik, K. Zarnack, R. Kellner, D. Begerow and M.
Feldbrügge (2010) *The RNA-binding protein Rrm4 is essential for efficient
secretion of endochitinase Cts1*. MCP. revised manuscript in preparation

Juli 2009

J. König, S. Baumann, J. Koepke, T. Pohlmann, K. Zarnack, and M.
Feldbrügge (2009) *The fungal RNA-binding protein Rrm4 mediates long-
distance transport of ubi1 and rho3 mRNAs*. EMBO J. 28: 1855 – 1866

August 2008

M. Feldbrügge, K. Zarnack, E. Vollmeister, S. Baumann, J. Koepke, J. König,
M. Münsterkötter, and G. Mannhaupt (2008) *The posttranscriptional
machinery of Ustilago maydis*. Fungal Genet. Biol. 45: S40-S46

Forschungsförderungen

- 11/ 2005 – 04/ 2007 Promotionsstipendium der *International Max Planck Research School* am Max-Planck Institut in Marburg
- Dezember 2009 Fonds zur Unterstützung weiblicher Erziehender in der Qualifikationsphase *Marburg University Research Academy* (MARA) der Philipps-Universität Marburg

Seminare

- August 2005 *Summer School Proteomics*, Brixen, Italien
- Juli. 2006 *Workshop Softskills: Scientific Writing and Presentation Technics*, Seminar der *International Max Planck Research School* am Max-Planck Institut in Marburg
- 11/ 2005 – 12/ 2006 *Workshop Proteomics*, Seminar der *International Max Planck Research School* am Max-Planck Institut in Marburg

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel "Die Rolle des RNA-bindenden Proteins Rrm4 während des polaren Wachstums von *Ustilago maydis*" selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen

Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort, Datum

(Janine Koepke)